



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

GUILHERME PEDRON FORMIGARI

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO HEPÁTICA
DO RECEPTOR GPR120 EM ANIMAIS OBESOS: IMPACTO NO CONTROLE DA
HOMEOSTASE GLICÊMICA**

**THE ROLE OF PHYSICAL EXERCISE AND OMEGA-3 FATTY ACIDS IN THE
MODULATION OF GPR120 EXPRESSION IN THE LIVER OF OBESE ANIMALS:
THE IMPACT IN THE CONTROL OF GLUCOSE HOMEOSTASIS**

Limeira

2016

GUILHERME PEDRON FORMIGARI

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO HEPÁTICA
DO RECEPTOR GPR120 EM ANIMAIS OBESOS: IMPACTO NO CONTROLE DA
HOMEOSTASE GLICÊMICA**

**THE ROLE OF PHYSICAL EXERCISE AND OMEGA-3 FATTY ACIDS IN THE
MODULATION OF GPR120 EXPRESSION IN THE LIVER OF OBESE ANIMALS:
THE IMPACT IN THE CONTROL OF GLUCOSE HOMEOSTASIS**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Nutrição e do
Esporte e Metabolismo, na Área de
concentração em Metabolismo e Biologia
Molecular.*

Orientador: Prof. Dr. Dennys Esper Cintra

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
GUILHERME PEDRON FORMIGARI, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. DENNYS ESPER CINTRA.

Limeira

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/15258-6

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

F767p Formigari, Guilherme Pedron, 1990-
O papel do exercício físico e do ômega-3 na modulação hepática do receptor GPR120 em animais obesos : impacto no controle da homeostase glicêmica / Guilherme Pedron Formigari. – Limeira, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Dennys Esper Cintra.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Ácidos graxos omega-3. 4. Resistência à insulina. I. Cintra, Dennys Esper, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of physical exercise and omega-3 fatty acids in the modulation of GPR120 expression in the liver of obese animals : the impact in the control of glucose homeostasis

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Inflammation

Omega-3 fatty acids

Insulin resistance

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Dennys Esper Cintra [Orientador]

Eduardo Rochete Ropelle

Ronaldo Vagner Thomatiele dos Santos

Data de defesa: 29-03-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autor: Guilherme Pedron Formigari.

Título: O papel do exercício físico e do ômega-3 na modulação hepática do receptor GPR120 em animais obesos: impacto no controle da homeostase glicêmica.

Natureza: Dissertação de Mestrado.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – Unicamp.

Data da Defesa: Limeira, 29 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dennys Esper Cintra

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

Assinatura

Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

Assinatura

Dedico este trabalho à família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Aos animais experimentais, com todo respeito e gratidão.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, por abrir as portas do conhecimento, por mudar minha visão de mundo, por todo apoio e infraestrutura fornecido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (nº do processo: 2014/15258-6), com toda sua seriedade, profissionalismo e compromisso, muito obrigado por toda a ajuda o que tornou possível a realização deste projeto.

Ao professor Dennys Esper Cintra, pela oportunidade de conhecer e aprender com a ciência, por toda paciência que teve comigo, por todos os conselhos, por todo o aprendizado, por todas as boas conversas, pelos elogios, pelos “puxões de orelha”, o meu muito obrigado será eterno.

Ao professor José Rodrigo Pauli, por toda atenção disponibilizada em resolver as minhas dúvidas, por todas as oportunidades, por todos os conselhos, aprendizados e elogios, muito obrigado.

Ao professor Eduardo Rochete Ropelle, por toda ajuda disponibilizada, por todos os conselhos e por sempre ser um exemplo de profissional.

À minha querida mãe, Mauren Jane, por todo carinho e preocupação, pelo suporte de vida e educação, por toda a ajuda emocional e financeira, pelos conselhos e elogios, por todas as nossas discussões que me fizeram crescer, muito obrigado mãe eu te amo muito.

Ao meu maravilhoso pai, Benedito Formigari, por todas as brincadeiras, por todos os conselhos, por toda ajuda emocional e financeira, pelo amor e carinho, meu agradecimento é eterno meu querido pai, te amo muito.

Ao meu irmão, Mayko Formigari, por muito tempo nossa relação foi marcada pela distância, porém nos últimos anos isso foi deixado de lado. Muito obrigado pela ajuda, apoio, conselhos, carinho e amor, eu te amo muito.

À minha amada e querida Letícia, você surgiu na minha vida, uma ótima surpresa, sua bondade e felicidade me ajudaram a buscar o equilíbrio que faltava na minha vida. Você é uma pessoa maravilhosa e linda. Peço desculpas por todas as vezes que a deixei de lado para realizar outros compromissos, você é encantadora e eu te amo muito. Simplesmente, perfeita! Muito obrigado por tudo.

Aos meus queridos avós, Darci e Miltez, por todo cuidado disponibilizado durante a minha infância, por todo carinho e amor, eu sei que esse sonho foi visto pelos senhores também, muito obrigado, amo vocês.

À minha tia, Mara, por toda sensibilidade e preocupação, por toda ajuda neste árduo caminho, pelos conselhos e pelas orações, obrigado.

À Gleida e Eliana, obrigado por acreditarem em mim.

Ao meu grande amigo Rafael, por todos os conselhos emocionais e profissionais, por toda ajuda no desenvolvimento do projeto, por nunca me deixar desistir, pelas longas horas de trabalho no laboratório, pelas risadas e boas conversas, pelo exemplo de pessoa que é, pela longa amizade, por tudo. Amigo, este trabalho também é seu, muito obrigado.

Ao recém professor Leandro, por toda ajuda, conselhos profissionais e por sempre ser um exemplo de dedicação.

À Mariana Bessi, por toda ajuda, paciência e parceria durante o desenvolvimento dos experimentos, muito obrigado Mari.

À Mariana Minanni, por toda ajuda, paciência, conversas e boas risadas sempre. Eu aprendi muito com você. Obrigado.

Aos colegas dos Laboratórios de Gênomica Nutricional (Alexandre, Camilla, Marcella Sant'Ana, Marcella Datilo, Patrícia e Vanessa) e Biologia Molecular do Exercício (Arthur, Bárbara Rodrigues, Bárbara Crisol, Chadi, José Diego, Luciene,

Rodolfo, Rodrigo Pereira, Rodrigo Gaspar e Vitor) por toda ajuda, conselhos, ótima convivência e, principalmente, pelas boas conversas e risadas. Muito obrigado amigos.

Por fim, agradeço ao apoio e suporte do Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC) e aos parceiros de pesquisa do Laboratório de Sinalização Celular (LabSinCel).

Eu posso aceitar a falha, todos falham em alguma coisa.

Mas eu não posso aceitar não tentar.

Michael Jordan

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma doença fora de controle, no qual drogas antiobesogênicas ou procedimentos cirúrgicos mostram-se ineficazes. A inflamação crônica e de baixo grau, característica da obesidade, contribui para o desarranjo metabólico e, neste contexto, o fígado surge como um dos principais órgãos afetados. Em linhas gerais, os ácidos graxos insaturados ômega-3 podem ajudar a reduzir a inflamação, por meio de seu receptor, GPR120, o qual desacopla o processo inflamatório oriundo de receptores do tipo *Toll* e de citocinas. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela regulação da expressão do GPR120 ainda não foram completamente compreendidos. Em paralelo, o exercício físico apresenta-se como importante aliado às estratégias anti-inflamatórias sistêmicas, com ênfase na regulação hipotalâmica da fome. No entanto, pouco se sabe sobre o papel do exercício físico sobre a modulação da expressão do receptor GPR120.

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da expressão do receptor de ácidos graxos insaturados GPR120 no fígado de animais saudáveis e obesos, após sessões de exercício físico aeróbio agudo ou crônico. Além disso, objetivou-se avaliar se a suplementação ou não com óleo fonte de ômega-3 (linhaça), concomitantemente às sessões de exercício poderiam interferir na expressão do receptor. Por fim, avaliar as possíveis interações e repercussões metabólicas, no que tange a sinalização hepática de insulina, as vias da glicogênese e neoglicogênese, bem como as vias pró- e anti-inflamatórias.

Materiais e métodos: Camundongos Swiss com 4 semanas de idade foram submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbio agudo, no qual fragmentos do tecido hepático foram removidos em diferentes tempos após o exercício para análise da expressão do GPR120. Em paralelo, um grupo de camundongos foi mantido em dieta normocalórica (CT) e outro, induzido à obesidade através do consumo de dieta hiperlipídica por 8 semanas. Após esse período, os animais obesos foram distribuídos em outros quatro grupos e tratados durante 30 dias da seguinte forma: grupo obeso sedentário (OB); grupo obeso treinado (OB+EXE); grupo obeso + óleo de linhaça (OB+OL) – 100 µL de óleo de semente de linhaça via gavagem; grupo obeso treinado + óleo de linhaça (OB+EXE+OL). Análises cromatográficas de varredura (lipidômica) foram realizadas para certificação da qualidade do óleo de linhaça. As vias de

sinalização da insulina, inflamatória, glicogênica e do $\omega 3$ foram analisadas por immunoblotting, com ou sem estímulo de insulina pela veia porta hepática. A sensibilidade à insulina foi aferida pelo teste de tolerância intraperitoneal (ITT) e o conteúdo de glicogênio foi analisado por espectrofotometria. Análises de variância (ANOVA) seguido pelo teste de significância de *Tukey* mostram-se significativos quando $P < 0,05$.

Resultados: Uma única sessão de exercício físico aeróbico não foi capaz de modular a expressão gênica e o conteúdo proteico de GPR120. No entanto, o exercício físico aeróbico crônico aumentou o conteúdo proteico de GPR120 no fígado de animais obesos quando comparado aos animais obesos sedentários ($P < 0,05$). Além disso, o tratamento com óleo da semente de linhaça também foi capaz de aumentar a quantidade proteica de GPR120 ($P < 0,05$). Ainda, o exercício físico crônico associado ou não ao óleo de linhaça aumentou a sensibilidade à insulina ($P < 0,05$). Com relação a propagação do sinal inflamatório, tanto o exercício físico quanto o óleo de semente de linhaça foram capazes de reduzir a atividade e o conteúdo das proteínas envolvidas com a inflamação ($P < 0,05$). Mesmo com a redução do processo inflamatório e aumento da sensibilidade à insulina, o conteúdo hepático de glicogênio não foi modificado de forma significativa.

Conclusão: As estratégias nutri e fisiogenômicas utilizadas neste trabalho indicam que tanto o exercício físico aeróbico crônico quanto o óleo de semente de linhaça aumentaram o conteúdo proteico de GPR120 no fígado de animais obesos e reduziram a atividade de proteínas envolvidas com o sinal inflamatório. Não houveram efeitos sinérgicos entre as estratégias adotadas, contudo, ambos, o exercício físico e o óleo de linhaça, podem contribuir de forma significativa para o restabelecimento, ainda que parcial, das sinalizações hepáticas, controladoras de funções primordiais no mais importante órgão metabólico de mamíferos.

Palavras-chave: Obesidade; Inflamação; Ácidos graxos ômega-3; Resistência à insulina; GPR120.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a condition out of control, wherein antiinflammatory therapies or surgical procedures are ineffective. A low grade and chronic inflammation is considered the main characteristic of obesity and contributes to the metabolic derangement. In this context, the liver appears as one of the affected organs. In general, omega-3 fatty acids can help reduce the inflammation through its receptor, GPR120, which interrupt the inflammatory process originated from Toll and cytokines receptors. However, the mechanisms responsible for regulating GPR120 expression are still not completely understood. In parallel, physical exercise is also able to reduce the progression of the inflammatory signal. However, little is known about the role of physical exercise on the modulation of GPR120 expression.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the modulation of expression of unsaturated fatty acid receptor, GPR120, in the liver of lean and obese mice after sessions of acute and chronic aerobic exercise. Moreover, we evaluate if the omega-3 supplementation together or not with chronic physical exercise could affect GPR120 expression. Furthermore, the metabolic repercussions in the liver and the pathways of glycogen, gluconeogenesis and inflammation were evaluated.

Materials and Methods: Swiss mice at 4 weeks-age were subjected to an acute aerobic exercise session, wherein fragments of the hepatic tissue were extracted at different times for analysis of gene expression and protein content of GPR120. In parallel, a group of mice was fed on a standard chow (CT) and another group was fed on a high fat diet for 8 weeks. After this period, obese mice were divided in four groups: sedentary obese (OB), trained obese (OB+EXE), obese + flax seed oil (OB+OL) – 100 μ L of flax seed oil for 30 days; trained obese + flax seed oil (OB+EXE+OL). Gas chromatography were performed to analyze the constitution of flax seed oil. The pathways of insulin, inflammation, glycogen and omega-3 were assessed by immunoblotting. The insulin sensitivity was evaluated by intraperitoneal insulin tolerance test and glycogen content was analyzed by spectrophotometry. Analysis of variance followed Tukey's test were used and $P < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Results: The acute aerobic exercise was not able to increase gene expression and protein content of GPR120. Nevertheless, the chronic aerobic exercise increased protein content of GPR120 in the liver of obese mice compared with sedentary obese group ($P<0,05$). In addition, flax seed oil treatment was also able to increase protein content of GPR120 ($P<0,05$). Moreover, chronic physical exercise together or not with flax seed oil increased insulin sensitivity ($P<0,05$). Furthermore, chronic exercise and flax seed oil supplementation were able to reduce activity and content of inflammatory markers ($P<0,05$). However, physical exercise and flax seed oil did not increase glycogen content compared with OB group.

Conclusion: The nutrigenomics and fisiogenomics strategies employed in this project showed that chronic aerobic exercise and flax seed oil supplementation were able to increase protein content of GPR120 in the liver of obese mice. In addition, these approaches decreased the progression of inflammatory signaling. Furthermore, we did not see a synergistic effect between physical exercise and flax seed oil. However, both contributed significantly to restoration of hepatic signaling.

Keywords: Obesity; Inflammation; Omega-3 fatty acids; Insulin resistance; GPR120.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Processo inflamatório interferindo na sinalização da insulina..... | 25 |
| Figura 2 | Ácidos graxos ômega-3 interferindo na propagação do sinal inflamatório..... | 29 |
| Figura 3 | Esteira rolante e teste de carga incremental..... | 34 |
| Figura 4 | Desenho Experimental..... | 36 |
| Figura 5 | Papel do exercício físico agudo associado aos ácidos graxos ômega-3..... | 40 |
| Figura 6 | Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos 0h; 8h; 16h; 24h e 48 horas..... | 44 |
| Figura 7 | Expressão gênica do receptor GPR120 após exercício físico agudo..... | 45 |
| Figura 8 | Conteúdo proteico de GPR120 após o protocolo de exercício físico agudo..... | 46 |
| Figura 9 | Associação do GPR120 com a proteína β -Arrestina-2 após tratamento com ômega-3..... | 48 |
| Figura 10 | Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos Exe+Soro, Exe+Glicose, Exe+OL e Exe+OL+Glicose..... | 49 |
| Figura 11 | Conteúdo de glicogênio hepático após exercício físico agudo..... | 49 |
| Figura 12 | Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos CTL e Exe+Soro..... | 50 |
| Figura 13 | Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+Glicose..... | 51 |
| Figura 14 | Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+OL..... | 52 |
| Figura 15 | Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+OL+Glicose..... | 53 |
| Figura 16 | Variação da massa corporal..... | 54 |
| Figura 17 | Teste de glicemia em jejum..... | 54 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 18 | Teste de tolerância a insulina (TTI) e glicose (TTG)..... | 55 |
| Figura 19 | Médias iniciais de massa corporal/resistência à insulina após distribuição dos animais..... | 56 |
| Figura 20 | Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL..... | 57 |
| Figura 21 | Comparação dos valores atingidos no teste de carga incremental após o período de treinamento físico com o teste inicial..... | 58 |
| Figura 22 | Variação da massa corporal após treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça..... | 59 |
| Figura 23 | Teste de tolerância à insulina (TTI) após treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça..... | 60 |
| Figura 24 | Depósitos de gordura epididimal, mesentérica e retroperitoneal após treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça..... | 61 |
| Figura 25 | Conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Controle e OB..... | 62 |
| Figura 26 | Conteúdo proteico de GPR120 nos grupos OB e OB+EXE..... | 63 |
| Figura 27 | Conteúdo proteico de GPR120 nos grupos OB e OB+OL..... | 63 |
| Figura 28 | Conteúdo proteico de GPR120 nos grupos OB e OB+EXE+OL.... | 64 |
| Figura 29 | Fosforilação da proteína TAK1..... | 65 |
| Figura 30 | Fosforilação da proteína I κ B α | 65 |
| Figura 31 | Fosforilação da proteína JNK..... | 66 |
| Figura 32 | Conteúdo proteico de TNF- α | 67 |
| Figura 33 | Conteúdo proteico de IL-1 β | 67 |
| Figura 34 | Conteúdo proteico de IL-10..... | 68 |
| Figura 35 | Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β após estímulo com insulina..... | 69 |
| Figura 36 | Fosforilação da proteína Akt..... | 70 |
| Figura 37 | Fosforilação da proteína GSK-3 β | 71 |
| Figura 38 | Conteúdo hepático de glicogênio após treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça..... | 72 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Protocolo de treinamento físico..... | 35 |
| Tabela 2 | Dieta indutora de obesidade..... | 37 |
| Tabela 3 | Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de linhaça..... | 47 |
| Tabela 4 | Comparação dos valores atingidos no teste de carga incremental após o período de treinamento físico com o teste inicial..... | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------|--|
| Akt | Proteína quinase B |
| OB | Obeso |
| cDNA | DNA complementar |
| CD36 | Conjunto de diferenciação 36 |
| CEMIB | Centro multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência em animais de laboratório – UNICAMP |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas |
| CT | Controle |
| CTL | Controle |
| CTLR | Controle |
| DIO | Dieta indutora de obesidade |
| DHA | Ácido docosahexaenóico |
| DM2 | Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 |
| EPA | Ácido eicosapentaenóico |
| EXE | Exercício físico |
| FoxO1 | Fator de transcrição da família <i>forkhead</i> 1 |
| GLUT | Transportador de glicose |
| GLUT4 | Transportador de glicose 4 |
| GPCR | Receptor acoplado à proteína G |
| GS | Glicogênio sintase |
| GSK-3β | Glicogênio sintase quinase-3 beta |
| G6Pase | Glicose-6-fosfatase |

| | |
|--|--|
| HF | Dieta hiperlipídica |
| IB | <i>Immunobloting</i> |
| IP | Imunoprecipitação |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IDF | Federação Internacional de Diabetes |
| IKK | Inibidor da quinase K |
| IκB-α | Ikappa quinase B-alfa |
| IL-1β | Interleucina-1 beta |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| iNOS | Sintase do óxido nítrico induzível |
| IP³ | Inositol-1,4,5-trifosfato |
| IR | Receptor de insulina |
| IRS | Substrato do receptor de insulina |
| IRS-1 | Substrato do receptor de insulina-1 |
| IRS-2 | Substrato do receptor de insulina-2 |
| JNK | C-jun-N-terminal quinase |
| JAK | Janus kinase |
| Kg | Quilogramas |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MCP-1 | Proteína para a quimiotaxia de monócitos 1 |
| m/min | Metros por minuto |
| mmol/L | Milimolar por litro |
| NaCl | Cloreto de sódio |

| | |
|--------------------------------|---|
| NF-κb | Fator nuclear kappa b |
| ng | Nanogramas |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OL | Óleo de semente de linhaça |
| Q.S.P. | Quantidade suficiente para |
| Rpm | Rotações por minuto |
| SNC | Sistema nervoso central |
| PEPCK | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase |
| PI3q | Fosfatidilinositol 3-quinase |
| PI[4,5]P₂ | Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato |
| PI[3,4,5]P₃ | Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato |
| PLCβ | Fosfolipase C beta |
| P_{máx} | Potência máxima |
| PTP-1B | Proteína fosfatase-1B |
| RT-qPCR | <i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i> |
| TAB1 | Proteína de ligação à TAK1 |
| TAK1 | Fator de crescimento transformador beta ativado por quinase 1 |
| TLRs | Receptores do tipo <i>Toll</i> |
| TLR2 | Receptor do tipo <i>Toll</i> 2 |
| TLR4 | Receptor do tipo <i>Toll</i> 4 |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral-alfa |
| TTI | Teste de tolerância à insulina |
| TTG | Teste de tolerância a glicose |
| ω3 | Ômega |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------|-----------|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| κ | Kappa |
| μ | Micro |
| ω | Ômega |
| Σ | Somatório |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO: | 22 |
| 1.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS: | 31 |
| 2. OBJETIVOS: | 31 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: | 31 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS: | 32 |
| 3.1. Modelo e desenho experimental: | 32 |
| 3.2. Protocolo de adaptação ao exercício aeróbio agudo e crônico e teste de carga incremental para determinação da potência máxima: | 33 |
| 3.3. Protocolo de exercício físico aeróbio agudo: | 34 |
| 3.4. Protocolo de exercício físico aeróbio crônico: | 34 |
| 3.5. Tratamentos dietéticos: | 35 |
| 3.6. Perfil de ácidos graxos do óleo da semente de linhaça: | 37 |
| 3.6.1. SAPONIFICAÇÃO: | 37 |
| 3.6.2. ESTERIFICAÇÃO: | 37 |
| 3.6.3. ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA: | 38 |
| 3.7. Time-course de ativação do receptor GPR120: | 38 |
| 3.8. Papel do exercício físico agudo associado aos ácidos graxos ômega-3 sobre o conteúdo hepático de glicogênio: | 38 |
| 3.9. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTI) e à glicose (TTG): | 40 |
| 3.10. Reagentes e anticorpos: | 41 |
| 3.11. Extrações teciduais – Fígado e Tecido Adiposo: | 41 |
| 3.12. Immunoblotting: | 42 |
| 3.13. Imunoprecipitação: | 42 |
| 3.14. Glicogênio: | 43 |
| 3.15. RT-qPCR: | 43 |
| 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA: | 44 |
| 5. RESULTADOS: | 44 |
| 6. DISCUSSÃO: | 72 |
| 7. CONCLUSÕES: | 79 |
| REFERÊNCIAS: | 81 |

1. INTRODUÇÃO:

A obesidade é originada pela perda do fino controle coordenado entre a ingestão e o gasto energético e pode ser desencadeada por uma combinação de fatores, dentre eles os de ordem genética, ambiental, comportamental e socioculturais¹⁻³. A obesidade pode ser considerada o principal fator para o desenvolvimento de resistência à insulina⁴, diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2)⁴, dislipidemias⁵, hipertensão⁶, dentre outras doenças crônicas não transmissíveis⁷.

O consumo excessivo de gordura, predominantemente saturada, associado a um estilo de vida sedentário é capaz de interferir no controle da fome organizado pelo sistema nervoso central, precisamente no hipotálamo, contribuindo para o aumento da massa corporal, caracterizado como obesidade⁸. Tal condição é tida, atualmente, como um dos maiores problemas de saúde mundial, com perspectivas ainda mais alarmantes para o futuro próximo, caso nenhuma intervenção efetiva seja adotada de forma imediata^{2,9,10}.

Mais de um bilhão de pessoas adultas no mundo estão acima do peso sendo que destas, 507 milhões são consideradas obesas^{2,9-11}. De forma concomitante à propagação da obesidade encontra-se diretamente relacionado o aumento na prevalência de DM2, desencadeado pela condição de resistência à insulina. No mundo, aproximadamente 197 milhões de pessoas possuem algum grau de intolerância à glicose ou resistência à insulina¹¹. O cenário brasileiro não é diferente, no qual os últimos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam para 40% da população portadora de sobrepeso e, destas, 11% são consideradas obesas¹². Além disso, no Brasil estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas sejam portadoras de DM2¹³.

Além do DM2, a obesidade traz consigo uma série de doenças associadas como as diretamente relacionadas ao risco cardiovascular⁶, doenças neurodegenerativas^{14,15} e alguns tipos de câncer¹⁶. Ainda, doenças de ordem secundária se associam à obesidade como osteoartrite¹⁷, asma¹⁸, apnéia do sono¹⁹, síndrome do ovário policístico²⁰ e esteatose hepática²¹⁻²³. Independente do grau de correlação das doenças junto à obesidade, a resistência à insulina é o evento comum

entre todas e o processo inflamatório de baixo grau surge como característica fundamental para o desencadeamento desses processos^{7,8}.

Evidências apontam para o excesso de consumo de gorduras saturadas como evento desencadeador do processo inflamatório de baixo grau^{24,25}. Contudo, nem todos os ácidos graxos saturados apresentam tal capacidade. Tal hipótese foi inicialmente proposta quando certas semelhanças foram observadas entre a ativação do processo inflamatório induzido por determinados ácidos graxos em culturas celulares em comparação à induzida por determinadas cepas bacterianas^{25,26}.

Em resposta à microrganismos invasores, o organismo lança resposta inflamatória de alto grau, com o objetivo de destruir o agente, onde a alta concentração de proteínas inflamatórias e recrutamento de células do sistema imune configuram as características clássicas de um processo inflamatório como dor, calor, rubor, tumor e, caso a doença avance, perda da função tecidual^{27,28}. Tal resposta decorre da interação entre células do sistema imune, principalmente macrófagos e neutrófilos, com o lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram-negativas. Isso ocorre devido à presença de um receptor localizado na membrana destas células, conhecido como TLR (Receptores do tipo *Toll*), especialmente os TLR2 e 4. Esse receptor interage com o LPS por meio do reconhecimento da fração lipídica deste componente, iniciando a resposta inflamatória^{27,28}. Posteriormente foi descrito a presença desses receptores em células de tecidos não imunológicos como o adiposo²⁹.

De forma semelhante, ácidos graxos presentes em determinados alimentos, como carnes, leite e derivados, gordura de coco entre outros, são capazes de ativar tais receptores de forma homóloga⁸. No entanto, quando estimulados por ácidos graxos dietéticos, a resposta pró-inflamatória, apesar de ocorrer via TLRs, é tida como de baixo grau, por não manifestar as características anteriormente mencionadas de dor, calor, rubor e tumor⁸. Provavelmente isso se deve às baixas concentrações desses componentes na dieta.

Para fechar esse ciclo de indução do processo inflamatório, ácidos graxos estocados nos depósitos lipídicos e liberados na forma de ácidos graxos livres também apresentam capacidade indutora do processo inflamatório, disparando-o também através dos receptores do tipo *Toll*. Em linhas gerais tem-se que a inflamação

induzida pela dieta ou pelo processo obesogênico é incapaz de gerar os sinais clínicos da inflamação, vistos apenas em processos de alto grau inflamatório^{8,25,26}.

Os TLRs induzem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), proteína para a quimiotaxia de monócitos (MCP-1), sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) e diversas outras com o objetivo de estimular a migração de leucócitos para o foco inflamatório e degradação dos agentes invasores^{27,28}. Após uma intrincada alteração na conformação de diversas proteínas na base dos receptores *Toll*, a ativação da enzima IKK (Inibidor da quinase K) induz a fosforilação e degradação do I κ B- α (Ikappa quinase B-alfa). O I κ B- α ancora consigo as duas subunidades do fator de transcrição (p50 e p65), denominado fator nuclear kappa B (NF- κ B), que cuidará da transcrição das demais proteínas inflamatórias. Com o I κ B- α degradado, as moléculas de NF- κ B encontram-se livres para migrarem ao núcleo e ativarem a transcrição de genes pró-inflamatórios, intensificando e perpetuando a inflamação e o transporte de macrófagos para o foco da agressão (Figura 1)^{27,28}.

O processo inflamatório crônico prejudica as ações tecido-específicas da insulina³⁰. No sistema nervoso central (SNC), especificamente no centro regulador da fome e da termogênese, o hipotálamo, a resistência à ação de hormônios como a insulina e a leptina conduz ao desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético, resultando em obesidade, uma vez que são os principais agentes reguladores desses processos^{31–33}.

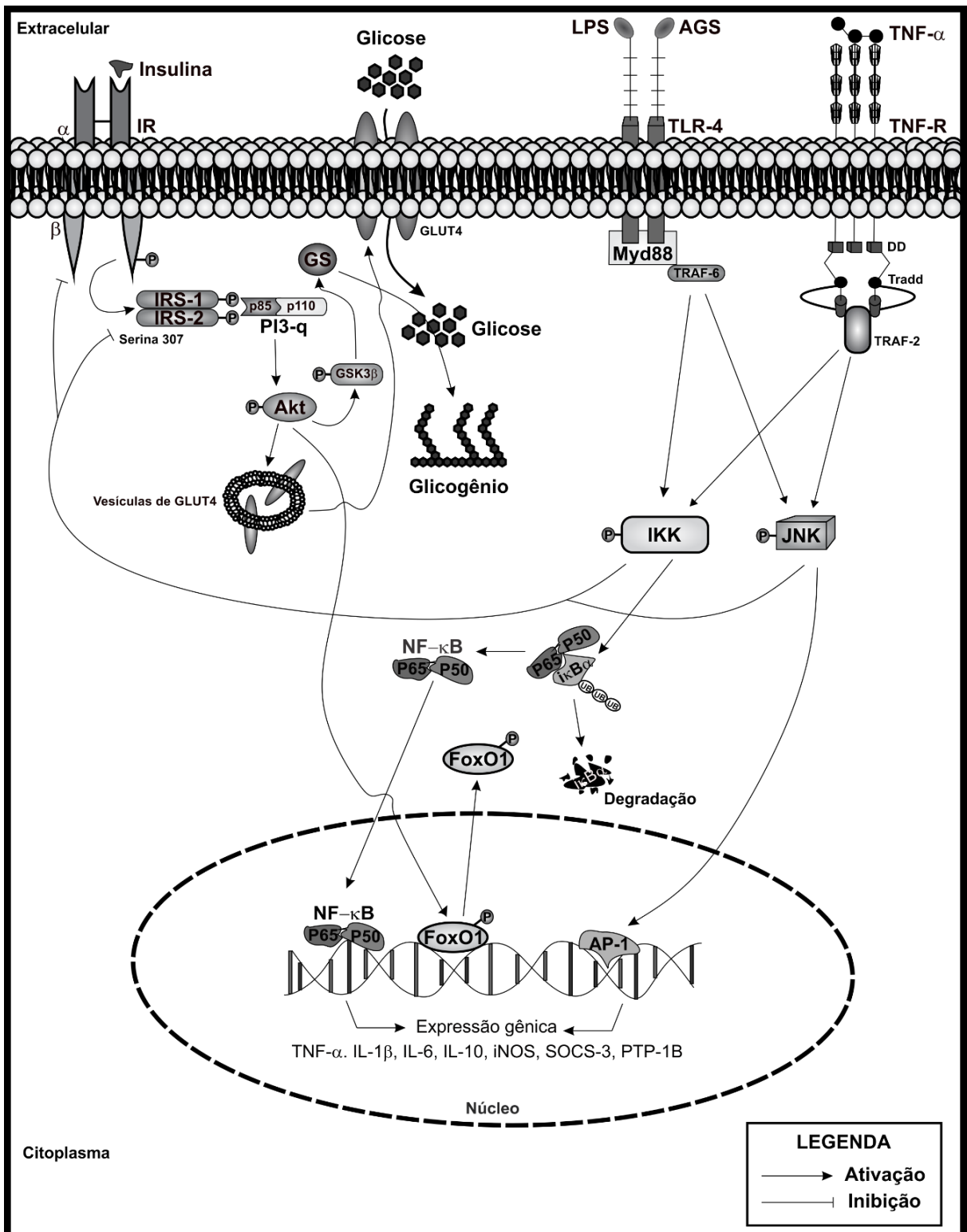


Figura 1. Processo inflamatório interferindo na sinalização da insulina. O receptor TLR4 é capaz de reconhecer o LPS e alguns tipos de ácidos graxos saturados iniciando a propagação do sinal inflamatório. Esta sinalização leva a fosforilação e ativação das proteínas IKK e JNK, que são capazes de atuar como serina-quinases, promovendo a fosforilação em serina 307 do IRS-1/IRS-2 e do IR, desse modo, reduzindo a fosforilação da proteína Akt. Além disso, as proteínas IKK e JNK levam a ativação dos fatores de transcrição NF-κB e AP-1, responsáveis por aumentar a transcrição de genes pró-inflamatórios, intensificando e perpetuando a inflamação.

Em tecidos como músculo esquelético e o adiposo branco, que são dependentes da insulina para a captação de glicose, a falha na transdução do sinal desse hormônio pode configurar estado hiperglicêmico ao organismo. Esse prejuízo na transdução do sinal da insulina pode diminuir a captação e utilização de glicose e aminoácidos, diminuir a síntese de proteínas e prejudicar o armazenamento de glicogênio no músculo esquelético^{34,35}. Além disso, com a sinalização da insulina prejudicada, há aumento na atividade lipolítica do tecido adiposo, e liberação acentuada de ácidos graxos livres na corrente sanguínea³⁶.

Tecidos independentes da insulina para captação de glicose, como o fígado, sofrem importantes alterações metabólicas. A resistência à transdução do sinal gerado pela insulina no hepatócito resulta em aumento na produção de glicose em situações pós-prandiais, associada ao prejuízo na supressão de sua produção hepática e concomitante redução na síntese de glicogênio. Tais efeitos culminam em drástico desequilíbrio do controle glicêmico sistêmico^{8,37,38}. A produção contínua e elevada de glicose pelo fígado estimula também, cronicamente, a secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas (β -pancreáticas), intensificando o estado hiperinsulinêmico, podendo levar tais células à falência⁸.

Desse modo a obesidade contribui para o desenvolvimento de doenças hepáticas, por meio do acúmulo de gordura visceral e esteatose hepática, onde a resistência à insulina promove síntese contínua de ácidos graxos a partir da glicose e redução da β -oxidação. Com isso o fígado tem sua capacidade transitória de armazenar lipídios excedida^{21,22}. O aumento dos níveis *in situ* de ácidos graxos e triglicérides está associado ao início da produção de radicais livres, através da peroxidação lipídica, devido aumento na respiração mitocondrial para eliminação do acumulado, bem como pela ativação de citocinas, culminando em esteato-hepatite não-alcoólica e, por vezes, em fibrose, seguindo ainda de perda na função do tecido e cirrose^{21,22}.

Para o controle inflamatório sistêmico oriundo da obesidade, as estratégias terapêuticas atuais existentes são insuficientes, não restando alternativa à morbidez da obesidade, que não a cirurgia bariátrica, a qual os efeitos colaterais não são completamente compreendidos e, além disso, tem-se observado importante re-ganho de peso após 4 anos de cirurgia³⁹. Ainda, estratégias farmacológicas de terceira geração trouxeram à tona drogas biológicas como *infliximab* (TNF- α), *etanercept*

(TNF- α), *adalimumab* (TNF- α) e *canakinumab* (IL-1 β), as quais atenuam o processo inflamatório ao inibirem, por diferentes formas, potentes moléculas desencadeadoras da inflamação como TNF- α e IL-1 β ^{40–45}. Contudo, tais medicamentos ainda se encontram em fase experimental, com custos que os impossibilitam^{40,41}. Sendo assim, alterações no estilo de vida são, atualmente, as recomendações mais seguras e eficazes^{46,47}.

Terapias não-farmacológicas são incentivadas, e a utilização de ácidos graxos insaturados como os da família dos ômega 3 são reconhecidos por reduzirem o risco de desenvolvimento de doenças crônicas, devido às suas características anti-inflamatórias^{48,49}. Da mesma forma, o exercício físico é capaz de propagar respostas anti-inflamatórias através de mecanismos específicos, como será demonstrado mais a frente.

Ácidos Graxos Ômega-3:

Nesse contexto, diversos trabalhos demonstram a capacidade de ácidos graxos insaturados da série “ômega-3” (ω 3) em interferirem na progressão do estado inflamatório^{48,50,51}, melhorando a sinalização da insulina em diversos tecidos, e repercutindo na retomada da homeostase da glicose^{50,51}.

Em estudo publicado em 2010, Oh *et al.*⁵⁰ (2010) verificaram a capacidade de ácidos graxos insaturados interagirem com um receptor de membrana acoplado à proteína G, conhecido como GPR120, despertando grande interesse da comunidade científica em virtude de seus potenciais terapêuticos. Tal receptor reconhece os ácidos graxos ω 3 e parece ser o principal desencadeador das respostas anti-inflamatórias observadas. De acordo com os pesquisadores, o mecanismo proposto se dá por meio da estimulação do GPR120 pelos ácidos graxos insaturados ω 3, o qual atrai para seu domínio intracelular a proteína citoplasmática β -arrestina-2. Esta, por sua vez, atua como corresponsável na desarticulação do processo inflamatório, por meio de sua ligação com as proteínas TAB1, 2 e 3 (Proteínas de ligação à TAK1), impedindo desse modo a ativação da TAK1 (Fator de crescimento transformador beta ativado por quinase 1). Com isso, ocorre o bloqueio da sinalização mediada pelos receptores do tipo TLR4 e de citocinas, interrompendo ativação da cascata inflamatória que culminaria com o aumento da atividade do fator de transcrição NF- κ B (Figura 2)⁵⁰.

Em estudo com animais experimentais, foi demonstrado que a substituição de ácidos graxos saturados por insaturados na dieta é capaz de reduzir o consumo alimentar, bem como a ativação de proteínas pró-inflamatórias (IKK, JNK, TNF- α), tanto quando tratados de forma aguda, intracerebroventricular, com ácidos graxos purificados, como quando oferecidos de forma regular e equilibrada na dieta⁵². Tais fenômenos encontram-se também associados ao aumento na expressão de citocina anti-inflamatória (IL-10) no hipotálamo e em outros tecidos^{52,53}.

Ainda, os ácidos graxos ω 3 parecem ser capazes de melhorar a via de sinalização da insulina de forma independente da redução do processo inflamatório. Tais ácidos graxos parecem interferir na via da insulina, mediante ativação de uma proteína associada ao GPR120 conhecida como Gq α /11, que pode contribuir com a melhora na sensibilidade à insulina, contudo, sem mecanismo claramente definido⁵⁰. A ativação da proteína Gq α /11 induz a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática de adipócitos, aumentando assim a sensibilidade à insulina em animais obesos. O mecanismo pelo qual a Gq α /11 promove aumento na captação de glicose via GLUT4 ainda é desconhecido, entretanto, postula-se que a Gq α /11 atue de modo totalmente independente da ativação da proteína β -arrestina-2⁵⁰.

Com relação ao fígado, foi demonstrado que o GPR120 é expresso no tecido hepático e nos macrófagos residentes deste tecido, as células de Kupffer^{54,55}. Em estudo realizado com seres humanos, o tratamento com DHA por 18 meses foi capaz de reduzir marcadores inflamatórios e parâmetros histopatológicos associados com a esteatose hepática⁵⁴. Além disso, Raptis *et al.*⁵⁵ (2014) mostraram que ativação do receptor GPR120 em células de Kupffer é capaz de diminuir o processo inflamatório controlado pelo fator de transcrição NF- κ B, além de promover polarização dos macrófagos para a classe M2, conhecida por apresentar características anti-inflamatórias⁵⁵.

Neste ínterim, além da utilização de nutrientes como terapêutica não-medicamentosa para a obesidade e suas comorbidades, estudos indicam que o exercício físico é capaz de reduzir a propagação do processo inflamatório presente em doenças metabólicas, independente da perda de massa corporal^{35,56}. Sugere-se que a prática de exercício físico, tanto de maneira aguda como crônica, possa restaurar a sinalização da via da insulina e da leptina no sistema nervoso central

(hipotálamo), como também em tecidos localizados na periferia, como músculo esquelético e fígado^{56,57}.

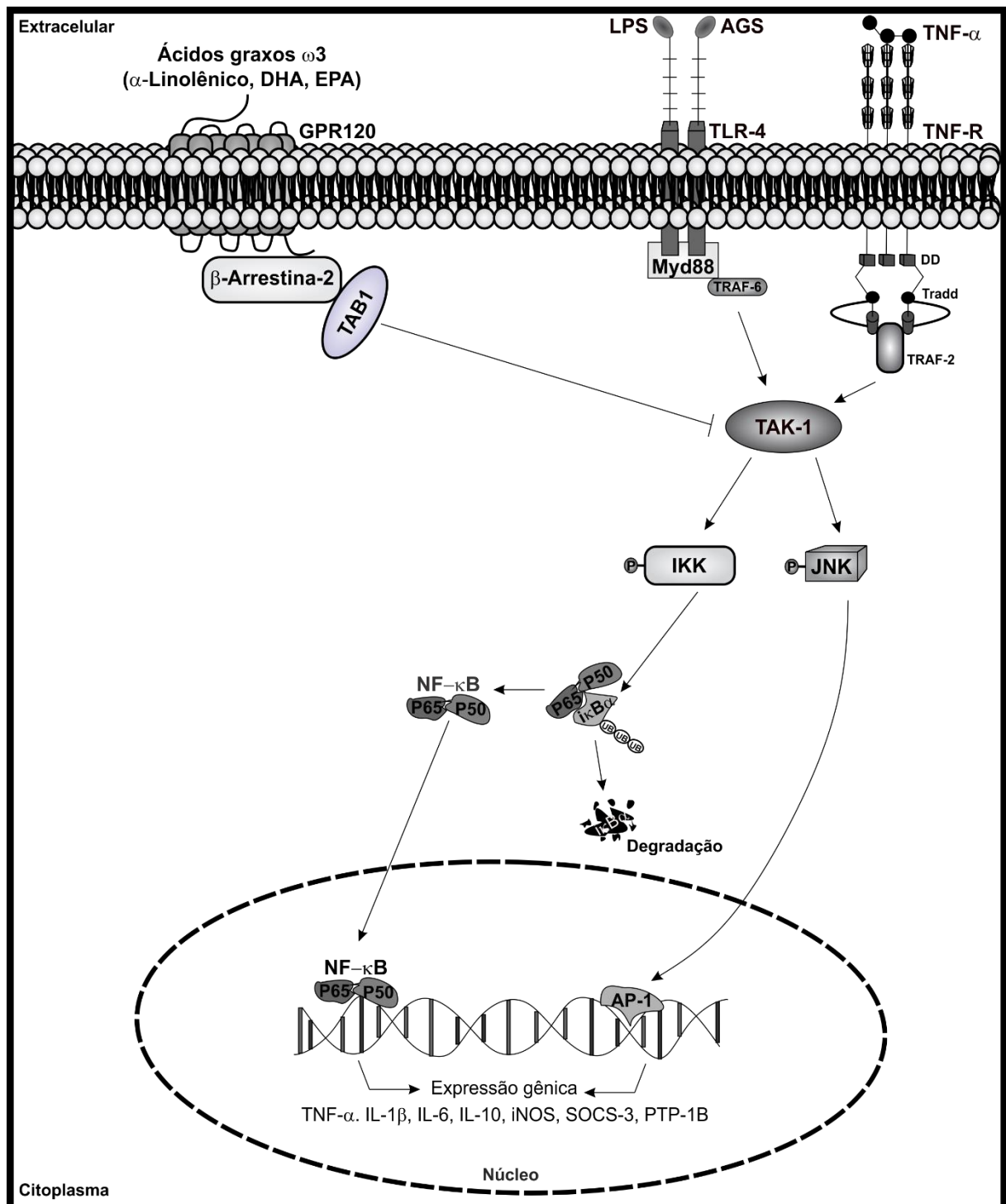


Figura 2. Ácidos graxos ômega-3 interferindo na propagação do sinal inflamatório. O receptor GPR120 reconhece os ácidos graxos da família ômega-3 (α -Linolênico, DHA, EPA). Em seguida, o GPR120 atrai para o seu domínio intracelular a proteína β -Arrestina-2 que diminui a associação da TAB1 com a proteína TAK1, impedindo a fosforilação e ativação da TAK1 e, consequentemente, redução da propagação do sinal inflamatório que culminaria na ativação das proteínas IKK e JNK.

Exercício Físico:

As melhoras metabólicas demonstradas em trabalhos envolvendo a prática de exercícios físicos podem ocorrer em resposta à diminuição do sinal inflamatório via TLR4 e TNF- α , com consequente redução da atividade de proteínas envolvidas com a propagação desta via, como IKK e JNK^{35,56}. Ainda, na periferia, o exercício físico parece ser capaz de aumentar a produção de IL-6, a qual é capaz de induzir, no sistema nervoso central, o aumento na expressão da citocina anti-inflamatória (IL-10)⁵⁷. A IL-10 atua reduzindo a fosforilação de IKK, impedindo a migração do NF- κ B em direção ao núcleo, o que resultaria em diminuição do processo inflamatório, com consequente melhora na ação da insulina e leptina no hipotálamo de animais expostos a dieta rica em gordura⁵⁷.

Em 2010, Ropelle *et al.*⁵⁷ demonstraram que a ausência de IL-6 praticamente impossibilita a ação anti-inflamatória da IL-10, reforçando de forma robusta a ideia de que o exercício físico é capaz de induzir alterações orgânicas importantes, ao alterar o ambiente celular, repercutindo no restabelecimento da homeostase orgânica em indivíduos dismetabólicos⁵⁷.

Com relação aos tecidos periféricos, o exercício físico é capaz de aumentar a atividade de proteínas envolvidas com a via da insulina, como a proteína quinase B (Akt)^{58,59}. No fígado, esta proteína é responsável por controlar a produção hepática de glicose, através da fosforilação e subsequente inibição do fator de transcrição FoxO1 (Fator de transcrição da família *forkhead* 1), principal responsável pela expressão de proteínas envolvidas com a gliconeogênese, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a glicose-6-fosfatase (G6Pase)⁵⁹⁻⁶¹.

Ainda, a Akt é capaz de regular a atividade da proteína glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3 β), a qual exerce controle na produção hepática de glicogênio. A GSK-3 β , quando ativa, bloqueia a atividade da enzima glicogênio sintase (GS), e a produção hepática de glicogênio fica comprometida. Ao ser fosforilada pela Akt, a GSK-3 β torna-se inativa e deixa de exercer função inibidora sobre a proteína GS, permitindo a síntese de glicogênio⁶¹. Portanto, o exercício físico pode contribuir para restaurar a ação da insulina no fígado de animais obesos e, assim, reduzir a produção hepática de glicose e consequentemente estimular a síntese de glicogênio^{61,62}.

Além disso, outros estudos indicam que o exercício físico reduz a expressão gênica da proteína fosfatase 1b (PTP-1B), que também ajuda a compor a compreensão sobre o mecanismo de resistência à insulina ao desfosforilar proteínas da via, fosforiladas em tirosina^{63–65}. Este é um mecanismo contrarregulador desta via de sinalização, contudo, ativado de forma aberrante em portadores do DM2⁶³.

1.1. Considerações finais:

Como visto, a obesidade atinge níveis pandêmicos e, juntamente às suas doenças correlatas, tem-se o quadro da condição metabólica mais incapacitante dos tempos modernos. Dietas equilibradas e o exercício físico são vistos como “senso comum” dentro do escopo de estratégias na luta contra doenças metabólicas. Contudo, nos últimos anos, alguns nutrientes e o exercício físico vêm demonstrando importante papel na melhora metabólica, indo além da “simples” oferta de nutrientes adequados e redução da ingestão calórica, ou do gasto energético induzido pelo exercício físico. Novos e intrincados mecanismos intracelulares vêm sendo elucidados com o apoio das ciências do esporte e nutrição, mostrando novas alternativas terapêuticas para as ciências médicas.

Caso o exercício físico seja capaz de modular a expressão gênica do receptor GPR120, provavelmente a presença concomitante de ácidos graxos ω 3 apresentaria resultados interativos mais profícuos, principalmente no que tange a existência de um processo inflamatório perante a doenças como obesidade e DM2. Com isso, espera-se melhora significativa nas vias de sinalização mediadas por estes ácidos graxos, no contexto das doenças metabólicas.

2. OBJETIVOS:

Avaliar a modulação da expressão do receptor de ácidos graxos insaturados GPR120 no fígado de animais magros e obesos, após sessões de exercício físico aeróbio agudo e crônico.

2.1. Objetivos específicos:

- a. Investigar os efeitos agudos do exercício físico sobre a expressão hepática do receptor GPR120.
- b. Determinar o melhor tempo pós-exercício físico para expressão do GPR120.

- c. Avaliar o tempo de absorção de $\omega 3$ e biodisponibilidade, com consequente ativação de sua via de sinalização celular hepática através da proteína β -arrestina-2.
- d. Aplicar o melhor tempo de exercício físico referente à expressão de GPR120, junto à infusão, por gavagem, de óleo de semente de linhaça, fonte de $\omega 3$, em sua maior biodisponibilidade.
- e. Avaliar a expressão de proteínas inflamatórias (p-I κ B- α , p-JNK, TNF- α , IL-1 β , IL-10), da via da insulina (p-Akt) e da via do $\omega 3$ (GPR120, β -arrestina-2, p-TAK1) em animais obesos e DM2 induzidos por dieta rica em gordura, após as intervenções de exercício físico e $\omega 3$.
- f. Determinar o grau de resistência à insulina (TTI – *Kitt*) em animais obesos, após as intervenções de exercício físico e $\omega 3$.
- g. Avaliar a produção hepática de glicogênio, bem como a expressão/atividade proteica das enzimas envolvidas no processo (p-Akt e p-GSK-3 β).

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA – UNICAMP), com o número de protocolo: 3512-1 (Anexo 2).

3.1. Modelo e desenho experimental:

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB). Os animais foram alocados em gaiolas individuais, acondicionados em ambiente com temperatura (21°C \pm 2) e fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro) controlados, receberam água e dieta padrão comercial (NUVILAB®) *ad libitum*.

Para realização do protocolo de exercício físico aeróbio agudo os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: G - sedentário (sem exercício), G0 - extração imediatamente após a sessão de exercício físico (T0'); G8 - extração após 8 horas da sessão de exercício; G16 - extração após 16 horas da sessão de exercício; G24 - extração após 24 horas da sessão de exercício; G48 - extração após 48 horas da sessão de exercício (Figura 4A).

Com relação ao treinamento físico, o mesmo teve início após indução da obesidade, por meio do consumo por dois meses de dieta hiperlipídica (DIO) (Tabela 2), onde então os animais demonstraram-se também resistentes à insulina, avaliados

pelo TTI e TTG (item 3.9.). Os animais obesos (OB) foram distribuídos em grupos, da seguinte forma: OB (Obeso sedentário + 100 μ L de soro fisiológico); OB-EXE (Obeso exercitado); OB+OL (Obeso sedentário + 100 μ L de óleo de semente de linhaça, o qual contém 52,3% de ω 3, do tipo C18:3 – alfa-linolênico, sendo a linhaça a maior fonte deste nutriente na natureza, via gavagem); OB+EXE+OL (Obeso exercitado + 100 μ L de óleo de semente de linhaça) (Figura 4B). Após realização da última sessão do treinamento físico, os animais foram mantidos em dieta padrão comercial ou hiperlipídica. Previamente a extração tecidual, todos os animais passaram por um período de jejum de 8 horas, os animais exercitados foram eutanasiados após 24 horas da última sessão de exercício e, nesse mesmo tempo, seus respectivos controles.

3.2. Protocolo de adaptação ao exercício aeróbio agudo e crônico e teste de carga incremental para determinação da potência máxima:

Os animais foram submetidos a dois protocolos de exercício físico aeróbio, sendo um agudo (única sessão) e um crônico (4 semanas). Para ambos, os camundongos foram adaptados ao exercício em esteira rolante durante 5 dias, 10 min/dia na velocidade de 3 m/min (Figura 3)⁶⁶. Conforme padronizado por Ferreira *et al.* (2007)⁶⁶, o teste de carga incremental foi realizado após dois dias da realização do período de adaptação. A velocidade inicial do teste foi de 6 m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3 m/min a cada 3 min até a exaustão voluntária dos camundongos, que ocorreu quando eles encostaram 5 vezes no final da esteira, no intervalo de 1 min. A potência máxima (P_{máx}), definida como a velocidade (m/min) de exaustão do animal, foi utilizada para a prescrição de intensidade no protocolo de exercício físico agudo e para o exercício físico crônico⁶⁶. Após dois dias da realização do teste incremental, os protocolos de exercício físico agudo e crônico foram realizados (itens 3.3. e 3.4.).

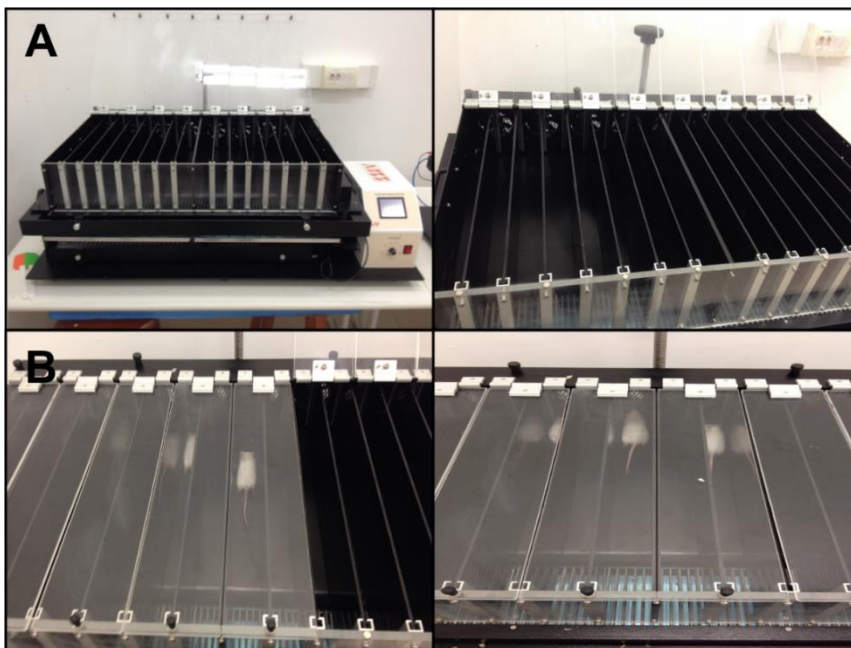


Figura 3. Esteira rolante e teste de carga incremental. A – Esteira rolante para múltiplos roedores utilizada durante a execução do projeto, fabricante AvS Projetos®. B – Camundongos Swiss com quatro semanas de idade, foram adaptados em esteira rolante, durante 5 dias. Após dois dias de repouso os animais realizaram o teste de carga incremental para determinação da potência máxima (P_{máx}).

3.3. Protocolo de exercício físico aeróbio agudo:

O protocolo de exercício aeróbio agudo foi baseado no estudo de Ferreira *et al.* (2007)⁶⁶, no qual os animais foram mantidos em dieta padrão comercial (NUVILAB®) e submetidos a uma única sessão de exercício de corrida em esteira, sem inclinação, com duração de 1h, utilizando-se 60% da potência máxima, de acordo com o teste de carga incremental. Posteriormente fragmentos de fígado foram removidos (item 3.11.) para diversas análises, de acordo com a divisão dos grupos experimentais (item 3.1.). O protocolo de exercício aeróbio agudo foi realizado após dois dias da execução do teste de carga incremental para determinação da P_{máx} (item 3.2.).

3.4. Protocolo de exercício físico aeróbio crônico:

Para o exercício físico aeróbio crônico, o mesmo protocolo de adaptação e determinação da P_{máx} anteriormente descrito foi aplicado (item 3.2.). Durante as 4 semanas de treinamento físico o volume foi aumentado gradativamente. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso⁶⁶. Na Tabela 1 é possível verificar as características de intensidade, volume, frequência, declinação, inclinação e intervalo entre as sessões do protocolo

de treinamento físico⁶⁶. O protocolo de exercício aeróbio crônico foi iniciado após dois dias da realização do teste de carga incremental para determinação da P_{máx}.

Tabela 1. Protocolo de treinamento físico

| Semana | Intensidade (% P _{máx}) | Volume (min) | Sessões diárias (Segunda à sexta-feira) | Declinação e inclinação (%) | Intervalo entre as sessões (Segunda à sexta-feira) |
|--------|--------------------------------------|-----------------|--|-----------------------------------|--|
| 1 | 60 | 15 | 1 | 0 | 24 horas |
| 2 | 60 | 30 | 1 | 0 | 24 horas |
| 3 | 60 | 45 | 1 | 0 | 24 horas |
| 4 | 60 | 60 | 1 | 0 | 24 horas |

Tabela 1. Protocolo de treinamento físico. Camundongos *Swiss* com 4 semanas de idade foram expostos a dieta hiperlipídica (DIO) por 8 semanas. Após período de adaptação à esteira rolante e realização do teste de carga incremental para determinação da P_{máx}, o treinamento físico foi iniciado, seguindo as características da tabela acima. P_{máx}, potência máxima; h, horas; min, minutos.

3.5. Tratamentos dietéticos:

A dieta utilizada como base foi a proposta pelo *American Institute of Nutrition* (AIN93-G), segundo Reeves (1993)⁶⁷. Para indução da obesidade, a dieta base foi modificada para conter 35% de lipídeos (312 g de banha + 40 g de óleo de soja)⁵² (Tabela 2). Os animais do grupo controle foram mantidos em dieta comercial, NUVILAB®.

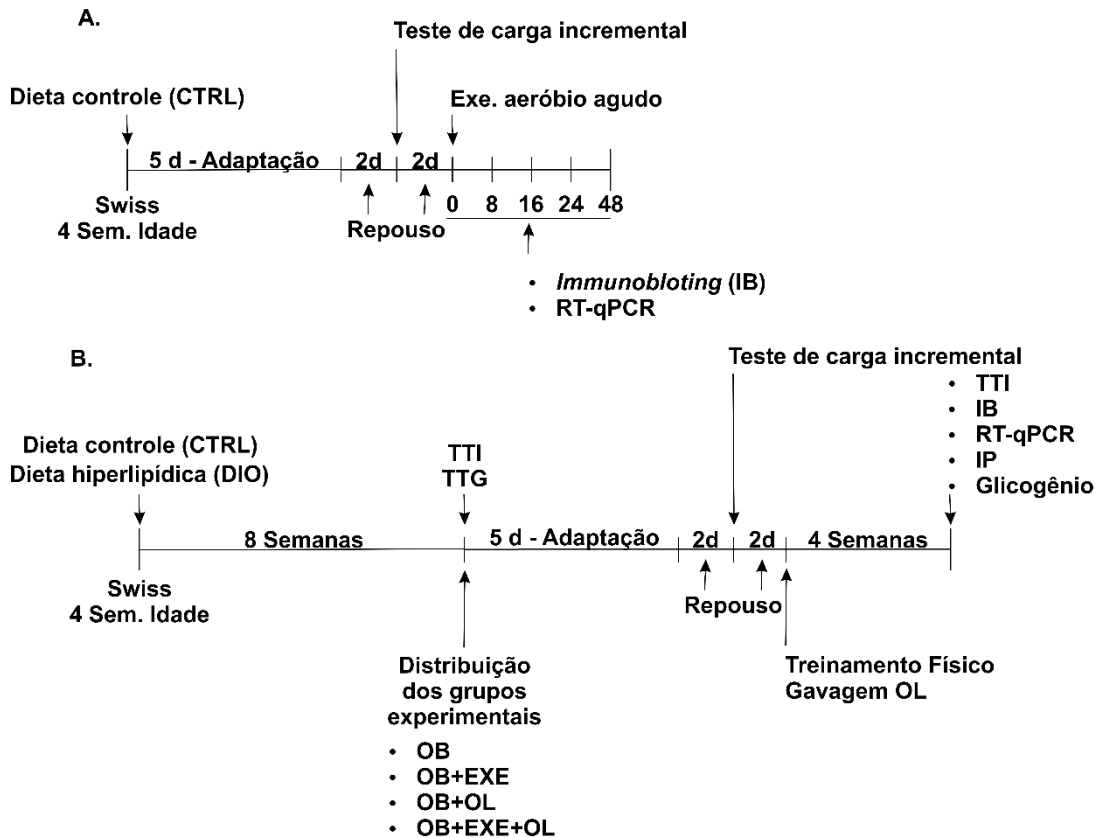


Figura 4. Desenho Experimental. A – Camundongos *Swiss* com quatro semanas de idade, foram adaptados em esteira rolante, durante 5 dias. Os animais realizaram o teste de carga incremental, para determinação da potência máxima ($P_{máx}$). Posteriormente ao período de repouso, a sessão aguda de exercício físico aeróbio (Exe. agudo) foi realizada. Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à extração de tecido hepático para análise da expressão gênica nos tempos 0h, 8h, 16h, 24h e 48h após a realização da sessão aguda de exercício físico. B – Camundongos *Swiss* foram expostos, durante 8 semanas, à dieta hiperlipídica (DIO) (Tab. 2). Ao final deste período, os animais realizaram os testes de tolerância à glicose (TTG) e insulina (TTI). Posteriormente, foram distribuídos através da distribuição em Z (*escore Z*) em grupos, de forma com que a média inicial dos grupos fosse homogênea para massa corporal/resistência à insulina. Para a realização do treinamento físico, o mesmo protocolo de adaptação e determinação de $P_{máx}$ anteriormente descrito foi aplicado. O treinamento físico foi composto por 4 semanas. Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à extração de tecido hepático para análise do conteúdo proteico de GPR120, das vias da insulina, glicogênio e inflamação.

Tabela 2. Dieta indutora de obesidade

| Ingredientes | Dieta DIO** |
|-----------------------------|-------------|
| | (1000 g) |
| Amido (Q.S.P.)* | 115,5 |
| Caseína | 200 |
| Amido de Milho Dextrinizado | 132 |
| Sacarose | 100 |
| Óleo de Soja | 40 |
| Banha | 312 |
| Celulose microfina (Fibra) | 50 |
| Mix Minerais | 35 |
| Mix Vitaminas | 10 |
| L-Cistina | 3 |
| Bitartarato de colina | 2,5 |
| TOTAL | 1000 |

Tabela 2. Dieta indutora de obesidade. *Q.S.P. – Amido adicionado em Quantidade Suficiente Para – completar 1000 g de dieta. **Dieta modificada para 35% de lipídios (312 g de banha + 40 g de óleo de soja)⁵². DIO – Dieta indutora de obesidade.

3.6. Perfil de ácidos graxos do óleo da semente de linhaça:

3.6.1. Saponificação:

Para a saponificação dos lipídios do óleo da semente de linhaça, utilizou-se a técnica descrita por Hartman e Lago (1973)⁶⁸, e tomou-se uma alíquota equivalente a 50 mg de lipídios para o interior de um tubo de ensaio de 15 mL. Foi adicionado 1 mL do reagente de saponificação (20 mL de NaOH a 50%, completado para 500 mL de metanol), agitou-se em Vortex e deixou-se a 100 °C em banho-maria durante 15 minutos.

3.6.2. Esterificação:

Posteriormente, procedeu-se a esterificação dos ácidos graxos, adicionando-se às amostras 2 mL de BF₃ (trifluoreto de boro – *Sigma*®), e mantendo sob agitação em vortex por 15 segundos. Os tubos foram aquecidos novamente a 100°C em banho-maria durante 20 segundos e resfriados em temperatura ambiente.

As amostras foram ressuspensas em 1 mL de isooctano (P.A.). Ainda, acrescentou-se 5 mL de NaCl para melhor separação das fases polares e apolares. Os ácidos graxos ressuspensos em isooctano foram coletados em pipeta de *pasteur*

para um eppendorf, onde o solvente foi evaporado por influxo de nitrogênio gasoso. Posteriormente as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, como descrito a seguir (item 3.6.3).

3.6.3. Análise em cromatografia:

Após saponificação e esterificação, o perfil de ácidos graxos do óleo da semente de linhaça foi determinado por cromatografia gasosa. Utilizou-se o cromatógrafo CG-17A Shimadzu/Class, com a coluna de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polysiloxane), de 100 m e 0,25 mm de diâmetro, com temperatura inicial de 140 °C isotérmico por 5 minutos e então aquecimento de 4 °C por minuto até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. A temperatura do vaporizador esteve em 250 °C e o detector em 260 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio em 20 cm/seg., a 175 °C. A razão da divisão da amostra no injetor foi de 1/50. Ressuspendeu-se a amostra em éter de petróleo (1 mL) e imediatamente após a ressuspensão, injetou-se 1 µL da solução.

Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões de metil ésteres conhecidos (*SIGMA Chemical Co*®) e quantificados por áreas de integração automática.

3.7. Time-course de ativação do receptor GPR120:

Para determinar o melhor tempo de ativação do receptor GPR120 pelo ômega-3, os animais receberam 500 µL de óleo da semente de linhaça (gavagem), após 8 horas de jejum. Em seguida, um fragmento do fígado dos animais foi removido nos tempos de 0, 120, 180, 210 e 240 minutos após realização da gavagem. Foram submetidos à imunoprecipitação (item 3.13.) com a proteína β -arrestina-2 e ao *immunoblotting* (item 3.12.) com a proteína GPR120, no qual, uma vez conectadas, indicam o início da atividade do receptor, uma vez que o GPR120 possui alta afinidade pelo ω 3.

3.8. Papel do exercício físico agudo associado aos ácidos graxos ômega-3 sobre o conteúdo hepático de glicogênio:

Os dados obtidos após a realização de testes pilotos indicavam que o pico de expressão de GPR120 ocorria após 24 horas da realização da sessão de exercício físico agudo. Além disso, os dados mostravam que o melhor tempo de conexão do ω 3

ao receptor GPR120 (item 3.7.) ocorria após 3 horas da administração oral do óleo de semente de linhaça. Desse modo, baseado nesses resultados preliminares, o experimento descrito a seguir foi realizado.

Após 12 horas da realização da sessão de exercício físico agudo, os camundongos em dieta padrão foram deixados em jejum alimentar para nivelamento do conteúdo de glicogênio hepático. Após nove horas do início do jejum, os animais receberam, via gavagem, 500 μ L de óleo de semente de linhaça ou 500 μ L de soro fisiológico (placebo). Após duas horas e trinta minutos da gavagem, os animais receberam dois gramas de glicose/Kg ou soro fisiológico via i.p. (intraperitoneal). Após trinta minutos, totalizando vinte e quatro horas da realização do exercício físico agudo, os animais, devidamente anestesiados, foram eutanasiados para remoção do tecido hepático (Figura 5).

Posteriormente, foi realizada análise da atividade das proteínas envolvidas com a glicogênese (Akt e GSK-3 β) (item 3.12.) e do conteúdo hepático de glicogênio (item 3.14.). Os grupos foram divididos da seguinte forma:

- 1 – Sedentário (CTL).
- 2 – Exercício + 500 μ L soro via gavagem + 100 μ L soro i.p. (Exe+Soro).
- 3 – Exercício + 500 μ L soro via gavagem + 2 g glicose/Kg i.p. (Exe+Glicose).
- 4 – Exercício + 500 μ L óleo de linhaça via gavagem + 100 μ L soro i.p. (Exe+OL).
- 5 – Exercício + 500 μ L óleo de linhaça via gavagem + 2g glicose/Kg i.p. (Exe+OL+Glicose).

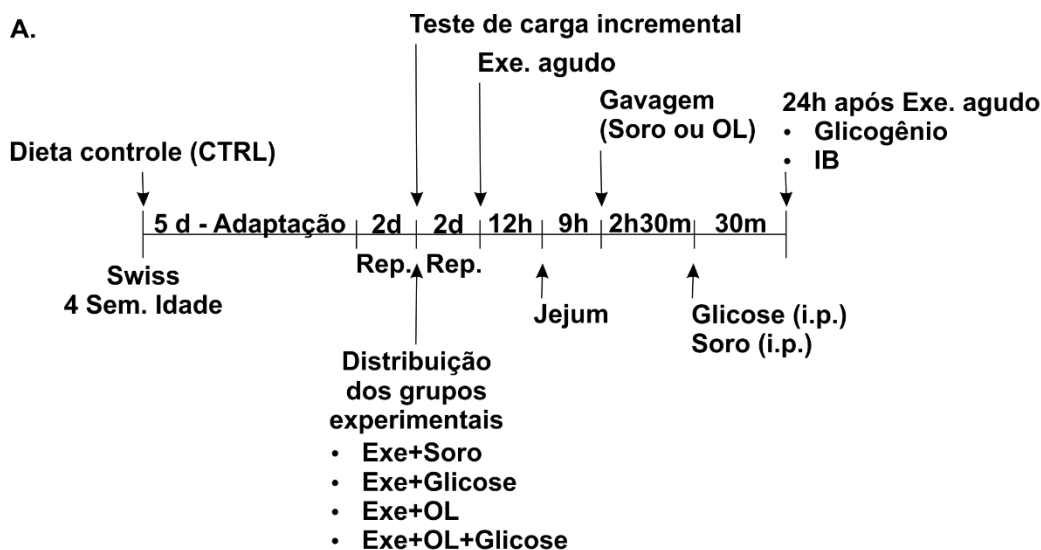


Figura 5. Papel do exercício físico agudo associado aos ácidos graxos ômega-3. A – Camundongos Swiss com quatro semanas de idade participaram do período de adaptação, teste de carga incremental e foram expostos ao protocolo de exercício físico agudo. Com 12 horas da realização do exercício, os animais foram deixados em período de jejum alimentar. Após 9h do início do jejum, os animais receberam 500 μ L de soro fisiológico ou óleo de linhaça, via gavagem. Após 2 horas e 30 minutos da gavagem, os animais receberam 2 gramas de glicose/Kg ou soro fisiológico via i.p. Após mais 30 min., deu-se início a extração tecidual. Sem - semanas; d - dias; m - minutos; h - horas; i.p. - intraperitoneal, IB - immunoblotting.

3.9. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTI) e à glicose (TTG):

Para avaliar a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, os testes foram executados antes e após os tratamentos com as dietas específicas. Após 8 horas de jejum, foi realizado corte distal na cauda dos animais para que fosse efetuada a primeira coleta de sangue para a dosagem basal de glicose, o que equivale ao tempo zero (t_0) do teste.

Para o TTI: A insulina (1 U/Kg de peso corporal) foi injetada via intraperitoneal (i.p.) e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min. para a determinação da glicose sérica. Para calcular a velocidade da constante de decaimento da glicose (K_{itt}) foi utilizado o programa INSTAT®, realizando-se regressão linear, no qual os valores de glicemia foram transformados em números neperianos para obtenção do K_{itt} .

Para o TTG: injetou-se via i.p. solução de glicose a 25% (2 g/Kg de peso corporal), com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, para as dosagens de glicose sérica. Em seguida, a área sob a curva foi

calculado em cada grupo experimental. Os valores de glicemia obtidos durante os testes de TTI e TGG foram determinados com o equipamento *Accutrend Plus* (Roche, Switzerland).

3.10. Reagentes e anticorpos:

Os reagentes e aparelhos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Tris (Hidroximetil) aminometano, pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina e ditioneitol (DTT) foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO). Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi fornecido pela *Bio-Rad* (Richmond, CA), triton X-100, tween-20, e fluoreto de sódio foram da *Amresco* (Ohio, USA). A membrana de nitrocelulose (0,2 μm) foi fornecida pela *Bio-Rad* (Richmond, CA) e os reagentes de quimioluminescência foram da *ThermoFisher Scientific* (Rockford, IL). Os anticorpos monoclonais e policlonais foram provenientes da *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA) e *Cell Signaling Technology* (Boston, USA), conforme especificidade do método.

3.11. Extrações teciduais – Fígado e Tecido Adiposo:

No último dia de experimento, os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal (i.p.) de Ketamina (100 mg/kg) e Diazepam (10 mg/Kg). Com o abdômen exposto, foi infundida a dose de 100 μL de insulina ou soro fisiológico (placebo) via porta-hepática para estímulo das proteínas da via da insulina. Após 30 segundos um fragmento do fígado foi removido. Além disso, os depósitos de gordura intraperitoneal, retroperitoneal e mesentérica também foram removidos para posterior pesagem em balança analítica. O tecido hepático foi homogeneizado em tampão de imunoprecipitação, contendo 10% de Triton X 100, 100 mM de Trisma base (pH 7,4), 10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C, com auxílio do Polytron PT 10-35 GT (*Kinemática AG*). O homogenato foi centrifugado à 11000 rpm por 40 minutos. No sobrenadante determinou-se a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (1976)⁶⁹ e, posteriormente, foi realizada a determinação do extrato total e do ensaio de *immunoblotting*.

3.12. *Immunoblotting*:

As amostras de extrato proteico total ou os imunocomplexos foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. Em determinadas situações, os géis foram cortados em regiões específicas para identificação das proteínas de interesse, de acordo com o peso molecular, e transferidas na mesma membrana de nitrocelulose para permitir a comparação entre diversos grupos experimentais. Posteriormente, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio para minimização de ligações inespecíficas (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0,02% de Tween 20) por 1 hora. Em seguida, a membrana foi incubada “*overnight*” com anticorpo primário. No dia seguinte, o anticorpo primário foi retirado e as membranas, após lavadas, incubadas por 1 hora na temperatura ambiente com o anticorpo secundário, referentes ao primário (das vias inflamatórias (p-I κ B- α , TNF- α , IL-1 β , IL-6, p-JNK, IL-10), da via da insulina (p-Akt), do glicogênio (p-GSK-3) e da via do ω 3 (GPR120, β -arrestina-2, p-TAK1)). O sinal foi detectado por quimioluminescência com kit específico (*SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate*, da *ThermoFisher Scientific*) e exposto em aparelho fotodocumentador (*Syngene® G:BOX Chemi XRQ*). As bandas geradas nas imagens foram quantificadas com auxílio do *software* UN-SCAN-IT gel 6.1.

3.13. *Imunoprecipitação*:

Para avaliar a atividade do receptor GPR120, realizou-se o teste de imunoprecipitação com anticorpo β -Arrestina-2 e *immunoblotting* com GPR120. A associação entre essas proteínas indica a transdução dos sinais do receptor⁷⁰. Os tecidos foram processados em tampão de imunoprecipitação (item 3.12.) com auxílio do *Polytron PT 10-35 GT (Kinemática AG)*. O homogenato foi centrifugado à 11000 rpm por 40 minutos. No sobrenadante determinou-se a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (1976)⁶⁹. Foi adicionado as amostras anticorpo específico para a proteína β -Arrestina-2 (10 μ L). Em seguida, as amostras foram incubadas a 4°C, sob agitação branda e contínua. Após doze horas, adicionou-se 30 μ L de proteína A sepharose e as amostras foram novamente incubadas a 4°C, sob agitação branda e contínua. Após duas horas, as amostras foram centrifugadas por

quinze minutos, a 11.000 rpm, 4° C. O pellet formado foi centrifugado três vezes (11.000 rpm, 5 min, 4° C) com 1 mL de solução de lavagem contendo 2 mM de ortovanadato de sódio, 100 mM de trisma base, 100 mM de EDTA e 0,5% de triton. Após realização das lavagens, adicionou-se as amostras 25 µL de tampão Laemmli (1970)⁷¹ para separação do complexo β -Arrestina-2/Anticorpo/Proteína A sepharose. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE) (item 3.12.).

3.14. Glicogênio:

Amostras do fígado foram coletadas e utilizadas para avaliar o conteúdo de glicogênio. A extração foi realizada de acordo com a proposta por Sjorgreen *et al.* (1938)⁷² e a coloração seguiu o modelo utilizado por Dubois *et al* (1956)⁷³. Primeiramente, um fragmento contendo 500 mg de tecido hepático foi colocado em tubo de ensaio de 15 mL e adicionou-se 2 mL de hidróxido de sódio 30% (KOH 30%). Em seguida, os tubos foram deixados em banho maria a 100° C por uma hora ou até a digestão total do tecido. Posteriormente, os tubos foram agitados e adicionou-se 200 µL de sulfato de sódio saturado (Na₂SO₄). Os tubos foram novamente agitados e 6 mL de etanol 70% foi adicionado em cada amostra, em seguida, os tubos foram colocados em banho maria até ebulição do etanol. Após a ebulição, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm, 5 min, temperatura ambiente e o sobrenadante foi desprezado por inversão. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de água destilada quente as amostra e o processo de ebulição e centrifugação descrito acima foi novamente realizado. Ao final deste processo, adicionou-se 5 mL de água destilada quente. Com relação ao método de coloração, adicionou-se as amostras (990 µL de água destilada e 10 µL de amostra) e aos padrões (10 µg/mL à 90 µg/mL de glicose) 10 µL de fenol. Em seguida, foi adicionado 2 mL de ácido sulfúrico e as amostras foram levadas novamente ao banho maria a 100° C por 15 minutos. Logo após, foi pipetado 300 µL das amostras e dos padrões em uma microplaca para posterior leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 490 nm.

3.15. RT-qPCR:

Fragmentos do fígado foram extraídos e homogeneizados em TRIzol® e o RNA total foi isolado de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 3000 ng de RNA total foi usada para a síntese de cDNA, com sistema de pré-amplificação Superscript (*Life Technologies*). Os primers utilizados foram GPR120:

Mm00725193_m1* (*ThermoFisher Scientific*) e GAPDH, # 4352339E (*ThermoFisher Scientific*), para camundongos.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

As variáveis em estudo foram inicialmente submetidas ao Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a simetria. Para variáveis com distribuição normal, foi utilizado o Teste “*t*” de Student, para comparação de duas amostras independentes. As variáveis com três ou mais grupos foram submetidas à análise de variância pelo teste ANOVA e ao teste *pós-hoc* de Tukey, para determinação da significância. Em algumas situações, realizou-se o teste ANOVA – *two way* e o *pós* teste de Bonferroni. Foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS:

Após a realização do período de adaptação a esteira rolante, os animais participaram do teste de carga incremental para determinação da potência máxima. A Figura 6 mostra as médias de P_{máx} e 60% da P_{máx} de cada grupo experimental após a execução do teste de carga incremental. Após dois dias de repouso, os animais realizaram o protocolo de exercício físico agudo, com intensidade de 60% da P_{máx} obtida por meio do teste de carga incremental. A extração do tecido hepático ocorreu de acordo com os tempos pré-determinados após realização do exercício físico agudo (0h, 8h, 16h, 24h e 48 horas).

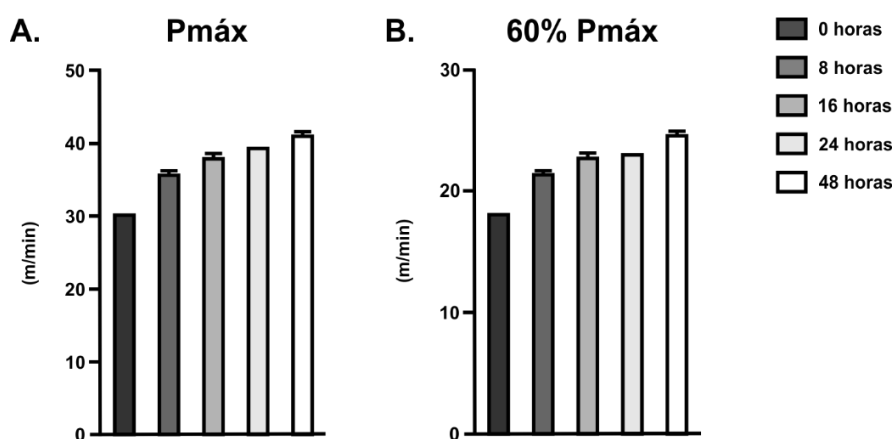


Figura 6. Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos 0h; 8h; 16h; 24h e 48 horas. A – P_{máx} atingida após reazalição do teste de carga incremental. B – Valores de 60% da P_{máx} atingida no teste. P_{máx} – potência máxima atingida no teste incremental; 60% P_{máx} – refere-se ao cálculo de 60% da potência máxima, sendo esta a velocidade dos animais no protocolo de exercício físico agudo. Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Em seguida deu-se início às análises moleculares para compreensão da relação do exercício físico agudo com o receptor GPR120 em camundongos magros (expostos a dieta padrão). A Figura 7 apresenta os resultados obtidos da expressão gênica do receptor GPR120 após a realização do RT-qPCR. Nota-se que o exercício físico agudo não foi capaz de aumentar a expressão hepática de GPR120 em nenhum dos tempos determinados para a extração do tecido hepático ($P>0,05$).

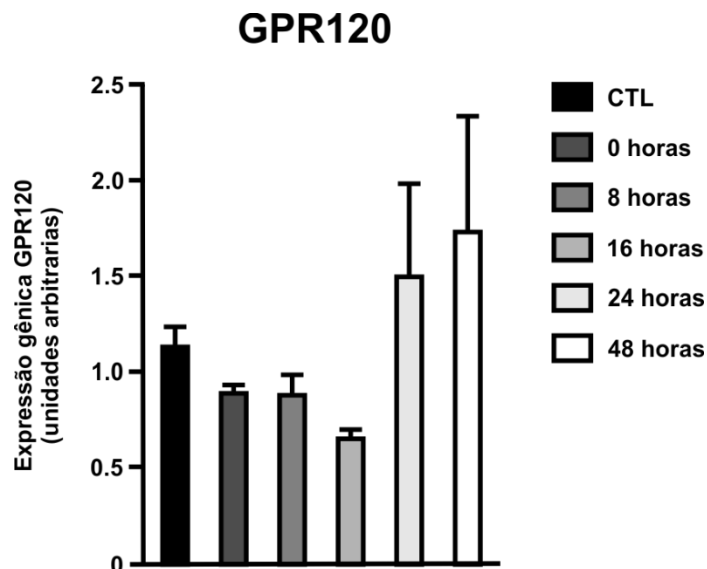


Figura 7. Expressão gênica do receptor GPR120 após exercício físico agudo. Camundongos *Swiss* foram adaptados em esteira rolante. Os animais realizaram o teste de carga incremental, para determinação da $P_{máx}$. Posteriormente, a sessão aguda de exercício físico foi realizada. Os fragmentos do tecido hepático foram extraídos nos tempos 0h, 8h, 16h, 24h e 48h após exercício físico agudo. Os resultados obtidos da expressão gênica do GPR120 foram normalizados pela expressão do GAPDH. CTL – grupo de animais sedentários ($n=5$); 0 horas – extração imediatamente após o exercício físico agudo ($n=5$); 8 horas – extração após 8 horas do exercício ($n=5$); 16 horas – extração após 16 horas do exercício ($n=5$); 24 horas – extração após 24 horas do exercício ($n=5$); 48 horas – extração após 48 horas do exercício ($n=5$). O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental com diferença entre grupos expressos em unidades arbitrárias.

Posteriormente, foi avaliado o conteúdo proteico de GPR120 utilizando a técnica de *immunoblotting*. A Figura 8 mostra a concentração proteica de GPR120 após realização do protocolo de exercício físico agudo nos tempos pré-determinados. De forma semelhante ao observado nas análises de expressão gênica (Figura 7), os diferentes grupos de camundongos que participaram do protocolo de exercício agudo não apresentaram aumento no conteúdo proteico de GPR120 quando comparados ao grupo de animais sedentários (CTL) ($P>0,05$).

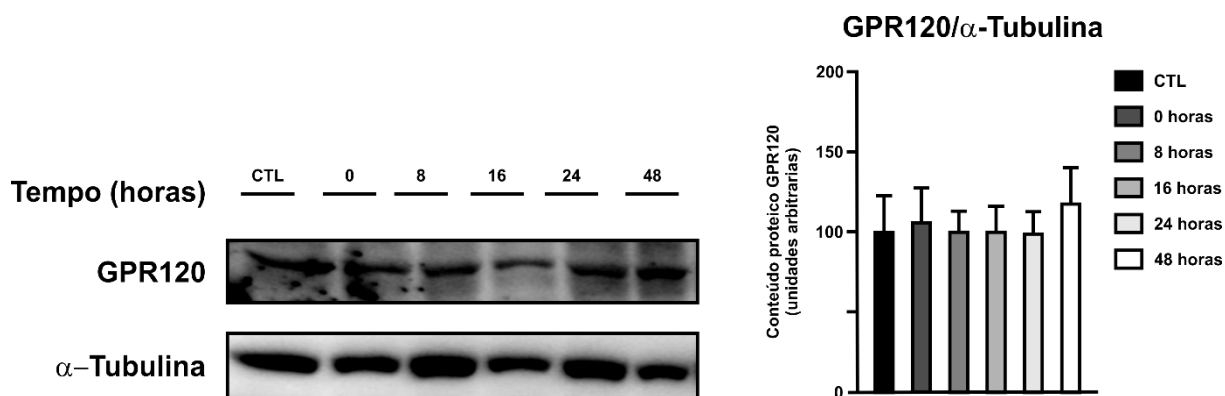


Figura 8. Conteúdo proteico de GPR120 após o protocolo de exercício físico agudo. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos diferentes grupos experimentais foram utilizados em experimentos de *immunoblotting*, para avaliar o conteúdo proteico de GPR120. Anticorpo específico para GPR120 foi utilizado para identificar a proteína. CTL – grupo de animais sedentários (n=5); 0 horas – extração imediatamente após o exercício físico agudo (n=5); 8 horas – extração após 8 horas do exercício (n=5); 16 horas – extração após 16 horas do exercício (n=5); 24 horas – extração após 24 horas do exercício (n=5); 48 horas – extração após 48 horas do exercício (n=5). O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Previamente ao início do tratamento com ômega-3, o óleo de semente de linhaça foi analisado por cromatografia gasosa, para verificar a composição e a porcentagem de ácidos graxos. Os dados obtidos mostraram que óleo de linhaça utilizado durante o experimento era composto por 52,3% do ácido graxo α -linolênico (C18:3 - ω 3) (Tabela 3). Em seguida, para determinar o melhor tempo de ativação do GPR120 pelo ômega-3, camundongos *Swiss* foram tratados com 500 μ L de óleo de linhaça (contendo 52,3% de ácido α -linolênico). A extração dos fragmentos do tecido hepático ocorreu em diversos tempos após a administração do óleo (0h, 2h, 3h, 3h e 30m e 4 horas). Posteriormente, a técnica de imunoprecipitação foi realizada para verificar a associação do GPR120 com a proteína β -Arrestina-2, a associação entre estas proteínas indica atividade do receptor GPR120. Os resultados obtidos após a análise mostraram que não houve diferença na associação entre as proteínas GPR120/ β -Arrestina-2 nos grupos pré-determinados (0h, 2h, 3h, 3h e 30min e 4h) após administração oral do óleo de linhaça ($P>0,05$) (Figura 9).

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de linhaça

| Ácidos Graxos (AG) | Porcentagem (%) |
|--------------------|-----------------|
| C14:0 | 0.0640 ± 0.018 |
| C15:0 | 0.0405 ± 0.008 |
| C16:0 | 5.7330 ± 0.001 |
| C17:0 | 0.0645 ± 0.002 |
| C18:0 | 4.6120 ± 0.001 |
| C20:0 | 0.1701 ± 0.000 |
| C22:0 | 0.1645 ± 0.002 |
| C24:0 | 0.1761 ± 0.020 |
| Σ AGS | 11.025 ± 0,008 |
| C16:1 | 0.0775 ± 0.002 |
| C17:1 | 0.0455 ± 0.002 |
| C18:1 | 22.215 ± 0.021 |
| Σ AGM | 22.493 ± 0.009 |
| C18:2 | 13.895 ± 0.007 |
| C18:3 (t) | 0.1934 ± 0.009 |
| C18:3 | 52.385 ± 0.021 |
| Σ AGP | 66.473 ± 0.007 |
| Σ ω6 | 13.895 ± 0.007 |
| Σ ω3 | 52.385 ± 0.021 |
| Razão ω6:ω3 | 0.27:1 |

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de semente de linhaça. Análise da composição e porcentagem dos ácidos graxos presentes no óleo de linhaça utilizado durante o experimento. Os dados representam a média e desvio padrão (±) de cada ácido graxo. AGS – Ácidos graxos saturados; AGM – Ácidos graxos monoinsaturados; AGP – Ácidos graxos poliinsaturados; t – Gordura trans; Σ – Somatório; ω3 – ômega-3; ω6 – ômega 6.

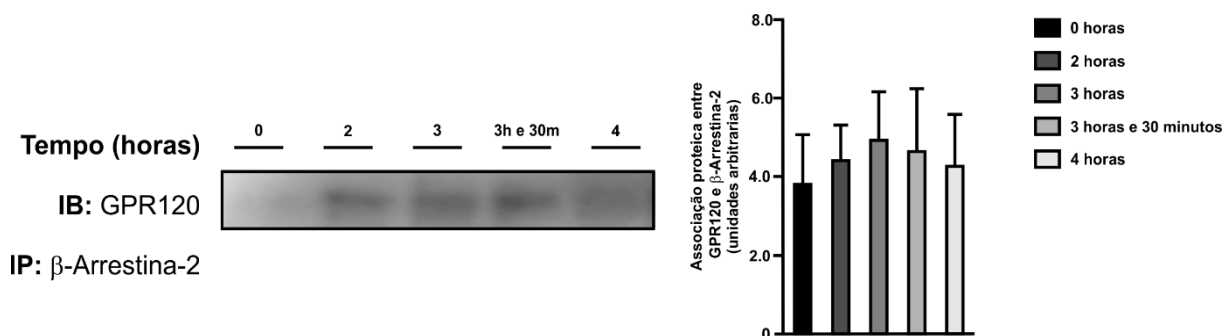


Figura 9. Associação do GPR120 com a proteína β -Arrestina-2 após tratamento com ômega-3. Fragmentos do tecido hepático de camundongos *Swiss* tratados agudamente com 500 μ L de óleo de linhaça (52,3% - ácido α -linolênico - C:18:3,), via gavagem, foram utilizados em experimentos de imunoprecipitação e *immunoblotting*. Anticorpos específicos para as proteínas GPR120 e β -Arrestina-2 foram utilizados durante os experimentos. 0 – extração imediatamente após a gavagem com óleo de linhaça (n=3); 2 horas – extração após 2 horas da gavagem com óleo de linhaça (n=3); 3 horas – extração após 3 horas da realização da gavagem com óleo de linhaça (n=3); 3 horas e 30 minutos – extração após 3 horas e 30 minutos da gavagem com óleo de linhaça (n=3); 4 horas – extração após 4 horas da gavagem com óleo de linhaça (n=3). O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Desse modo, a próxima etapa realizada foi a análise do conteúdo de glicogênio hepático. Para isso, os animais participaram do período de adaptação, do teste de carga incremental e foram submetidos ao protocolo de exercício físico agudo. Os valores de P_{máx} e 60% da P_{máx} obtidos durante o teste de carga incremental estão disponíveis na Figura 10. Após 24 horas da última sessão de exercício, os animais foram anestesiados e um fragmento do fígado foi removido para análise do glicogênio. O exercício físico e os diferentes tratamentos não foram capazes de aumentar o conteúdo hepático de glicogênio quando comparados ao grupo de animais sedentários ($P > 0,05$) (Figura 11).

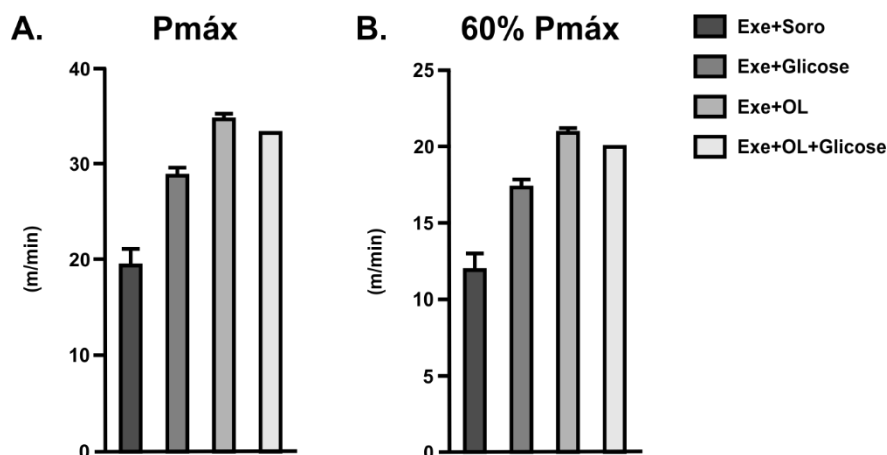


Figura 10. Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos Exe+Soro, Exe+Glicose, Exe+OL e Exe+OL+Glicose. A – Pmáx atingida após reavaliação do teste de carga incremental. B – Valores de 60% da Pmáx atingida no teste. Pmáx – potência máxima atingida no teste incremental; 60% Pmáx – refere-se ao cálculo de 60% da potência máxima, sendo esta a velocidade dos animais no protocolo de exercício físico agudo; EXE – exercício físico agudo; OL – óleo de semente de linhaça. Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

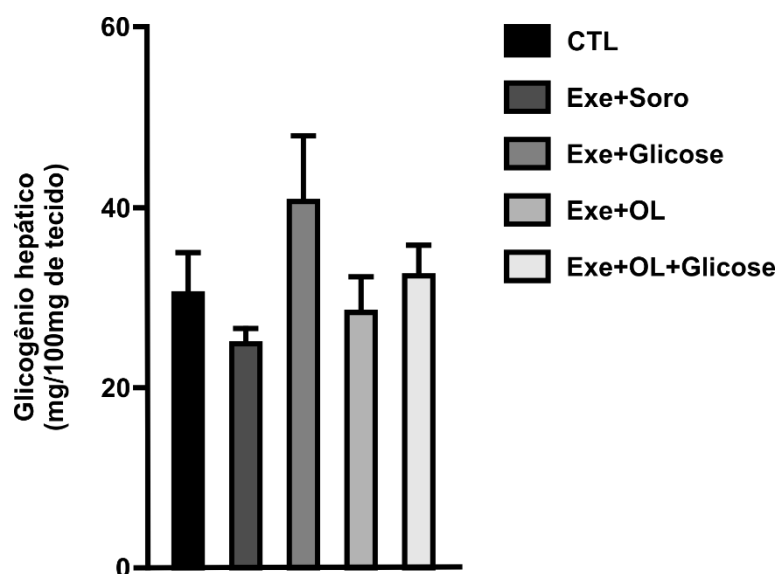


Figura 11. Conteúdo hepático de glicogênio hepático após exercício físico agudo. CTL – grupo de animais sedentários e que não receberam nenhum tratamento (n=5). Exe+Soro – animais que participaram do protocolo de exercício físico agudo e receberam tratamento com soro, via gavagem e i.p. (n=6). Exe+Glicose – animais que participaram do protocolo de exercício e receberam tratamento com soro, via gavagem, e glicose, via i.p. (n=6). Exe+OL – animais exercitados e que receberam tratamento com óleo de linhaça, via gavagem, e soro, via i.p. (n=6). Exe+OL+Glicose – animais exercitados e que receberam tratamento com óleo de linhaça, via gavagem, e glicose, via i.p. (n=12). O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Em seguida, analisou-se a atividade e o conteúdo das proteínas envolvidas com a síntese do glicogênio (Akt e GSK-3 β) e da via do ômega-3 (GPR120). A Figura 12 mostra a fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e o conteúdo proteico de GPR120 nos grupos CTL (animais sedentários) e Exe+Soro. O exercício físico agudo foi capaz de aumentar a fosforilação das proteínas envolvidas com a síntese de glicogênio ($P<0,05$). Entretanto, não houve aumento no conteúdo proteico de GPR120 ($P>0,05$).

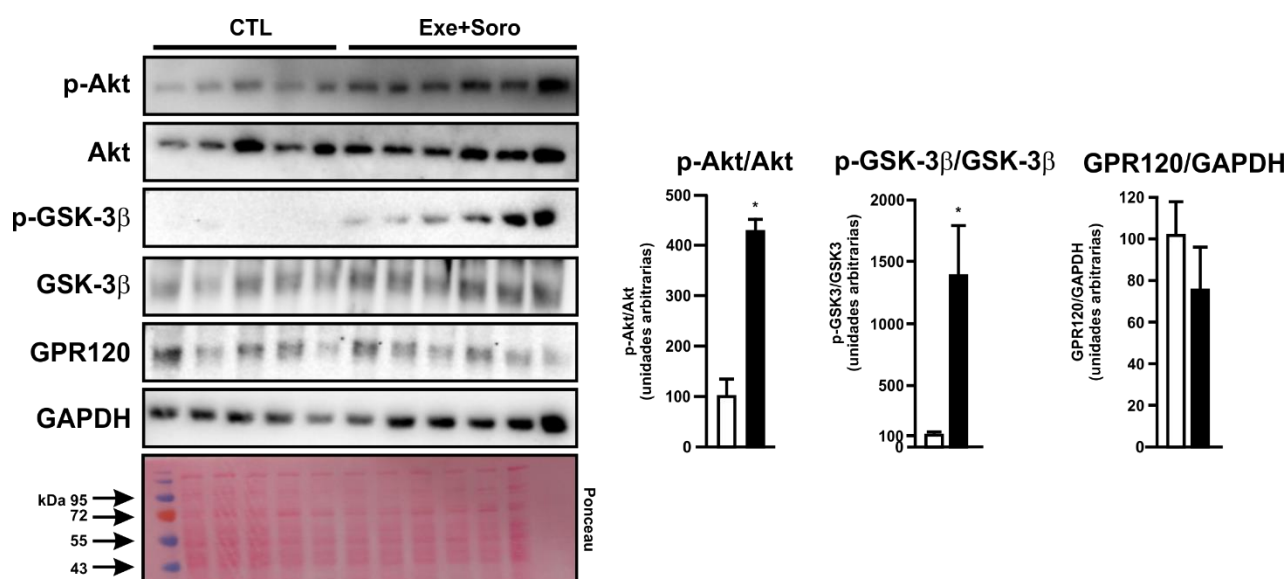


Figura 12. Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos CTL e Exe+Soro. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos CTL e Exe+Soro foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar conteúdo e atividade proteica. Anticorpo específico para GPR120, p-Akt, Akt, p-GSK-3 β e GSK-3 β foram utilizados para identificar as proteínas. CTL – grupo de animais sedentários e que não receberam nenhum tratamento ($n=5$); Exe+Soro – animais que participaram do protocolo de exercício físico agudo e receberam tratamento com sorbitol, via gavagem e i.p. ($n=6$). Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * $P<0,05$ vs CTL, teste t de Student.

Posteriormente, o grupo Exe+Soro foi comparado aos demais grupos exercitados, expostos aos diferentes tratamentos (Glicose, OL e OL+Glicose). O grupo Exe+Glicose apresentou aumento na fosforilação da proteína Akt quando comparado ao grupo Exe+Soro ($P<0,05$). Porém, este aumento não foi verificado com relação a proteína GSK-3 β e no conteúdo proteico de GPR120 ($P>0,05$) (Figura 13).

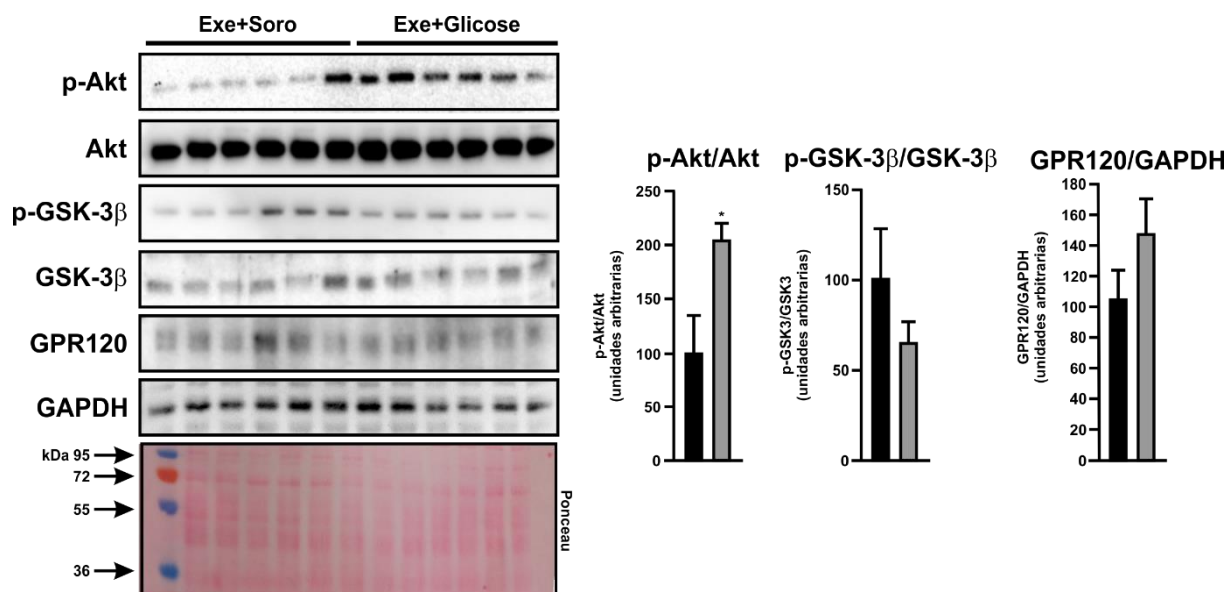


Figura 13. Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+Glicose. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos Exe+Soro e Exe+Glicose foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar a atividade e conteúdo proteico. Anticorpo específico para GPR120, p-Akt, Akt, p-GSK-3 β e GSK-3 β foram utilizados para identificar as proteínas. Exe+Soro – animais que participaram do protocolo de exercício físico agudo e receberam tratamento com soro, via gavagem e i.p. (n=6). Exe+Glicose – animais que participaram do protocolo de exercício físico agudo e receberam tratamento com soro, via gavagem, e glicose, via i.p. (n=6). Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. $*P < 0,05$ vs Exe+Soro, teste *t* de Student.

Com relação ao grupo de animais exercitados e tratados com óleo de linhaça, via gavagem (Exe+OL), não houve aumento na atividade das proteínas Akt e GSK-3 β e na quantidade proteica de GPR120 em relação ao grupo de animais exercitados tratados com soro fisiológico (Exe+Soro) ($P > 0,05$) (Figura 14).

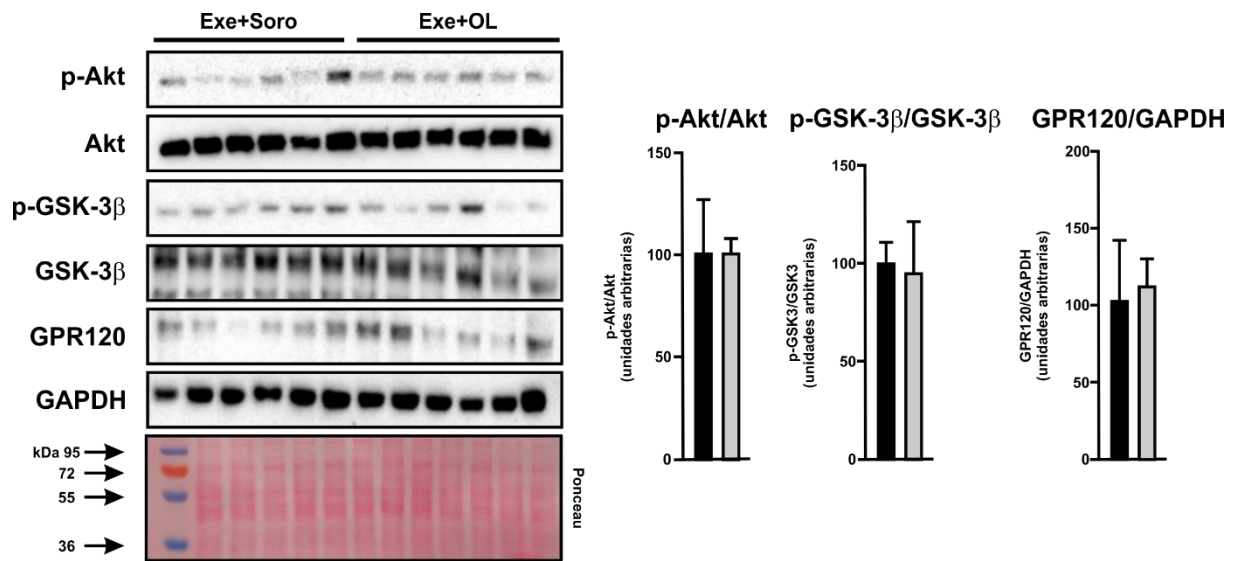


Figura 14. Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+OL. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos Exe+Soro e Exe+OL foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar o conteúdo e atividade proteica. Anticorpo específico para GPR120, p-Akt, Akt, p-GSK-3 β e GSK-3 β foram utilizados para identificar as proteínas. Exe+Soro – animais que participaram do protocolo de exercício físico agudo e receberam tratamento com soro, via gavagem e i.p (n=6). Exe+OL – animais exercitados e que receberam 500 μ L de óleo de linhaça, via gavagem e soro, via i.p (n=6). Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Por fim, a Figura 15 mostra os resultados do grupo Exe+OL+Glicose com relação ao grupo Exe+Soro. O exercício físico agudo em conjunto com o óleo de linhaça e glicose não aumentou a atividade das proteínas envolvidas com a síntese de glicogênio e a concentração proteica de GPR120 quando comparado ao grupo Exe+Soro ($P>0,05$).

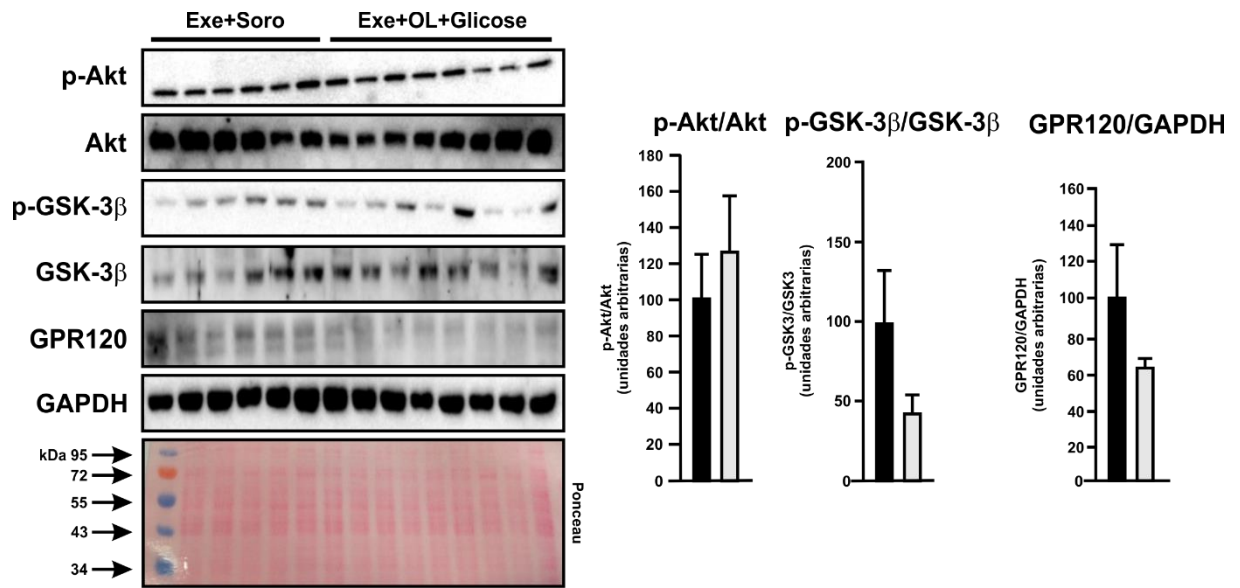


Figura 15. Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+OL+Glicose. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos Exe+Soro e Exe+OL+Glicose foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar o conteúdo e atividade proteica. Anticorpo específico para GPR120, p-Akt, Akt, p-GSK-3 β e GSK-3 β foram utilizados para identificar as proteínas. Exe+Soro – animais que participaram do protocolo de exercício físico agudo e receberam tratamento com soro, via gavagem e i.p (n=6). Exe+OL+Glicose – animais exercitados e que receberam tratamento com óleo de linhaça, via gavagem, e glicose, via i.p. (n=8). Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Posteriormente, deu-se início às análises fisiológicas e moleculares em modelos de animais obesos. Após 8 semanas, os camundongos expostos a dieta hiperlipídica (OB) apresentaram aumento da massa corporal em relação aos animais controle. Esse aumento no grupo OB foi evidenciado a partir da segunda semana de exposição à dieta rica em gordura ($P > 0,05$) (Figura 16).

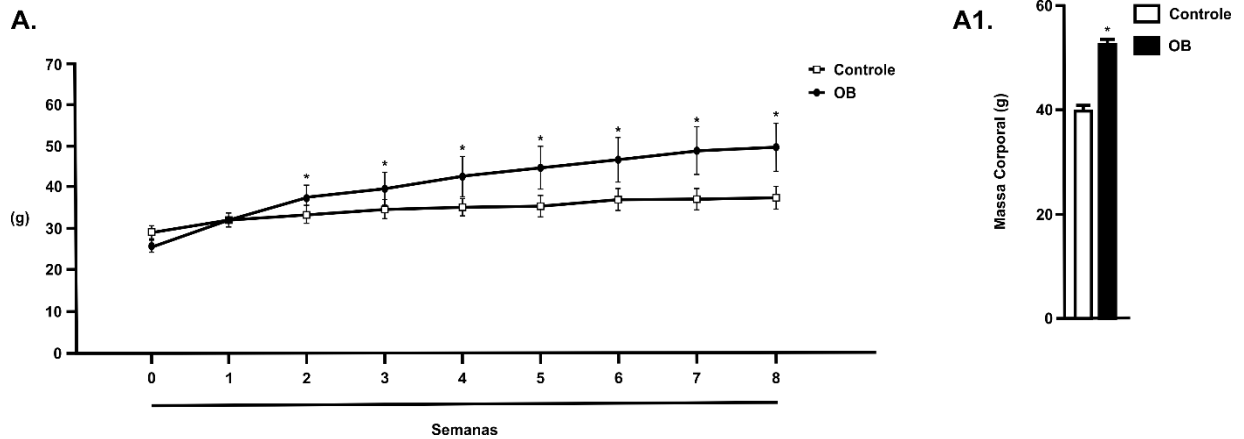


Figura 16. Variação da massa corporal. A – Variação da massa corporal durante 8 semanas de exposição a dieta padrão ou hiperlipídica. A1. – Média da massa corporal dos grupos experimentais ao final de 8 semanas. Controle – animais expostos a dieta controle durante 8 semanas (n=6); OB – animais expostos a dieta hiperlipídica (DIO) por 8 semanas (n=30). O gráfico de barras e de linhas representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * $P < 0,05$ vs Controle, teste t de Student.

Em seguida, verificou-se a homeostase glicêmica dos animais expostos ou não a dieta hiperlipídica. Para isso, os animais foram deixados em jejum alimentar por 8 horas e, posteriormente, a glicemia foi coletada. Os valores obtidos mostraram que os camundongos do grupo OB apresentavam maiores valores de glicemia em jejum quando comparados ao grupo de animais controle ($P < 0,05$) (Figura 17).

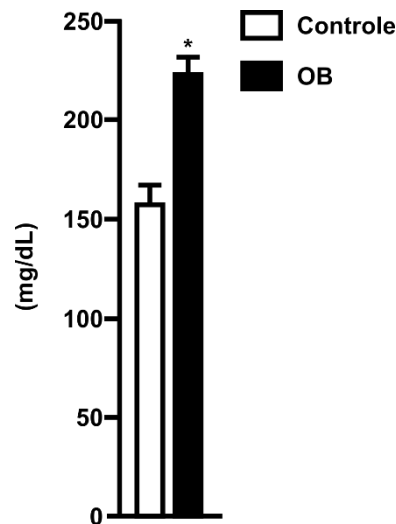
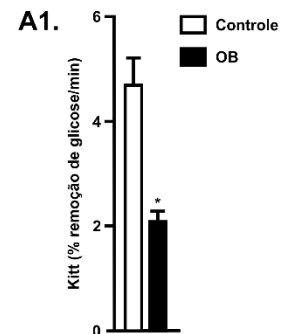
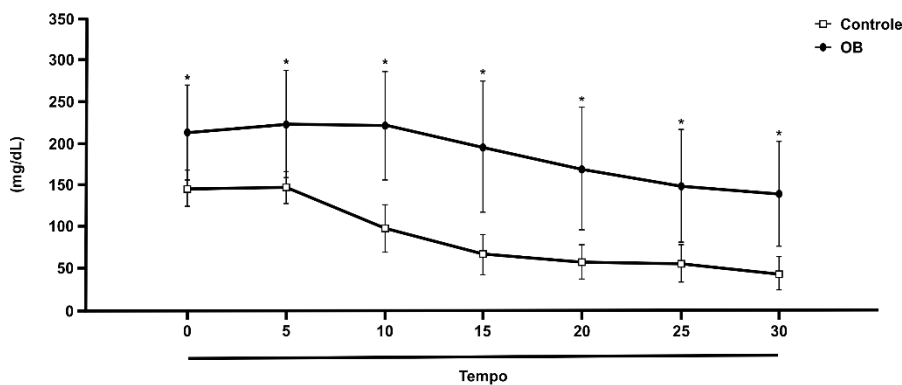


Figura 17. Teste de glicemia em jejum. Após 8 horas de jejum alimentar, coletou-se a glicemia dos animais expostos ou não a dieta hiperlipídica. Controle – animais expostos a dieta padrão durante 8 semanas (n=6); OB – animais expostos a dieta hiperlipídica (DIO) por 8 semanas (n=30). O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * $P < 0,05$ vs CTL, teste t de Student.

Desse modo, para determinar o grau de resistência à insulina e intolerância à glicose, testes de TTI e TTG foram realizados após 8 semanas de oferta de dieta hiperlipídica. Os camundongos expostos a dieta rica em gordura exibiram menor taxa de decaimento de glicose (*Kitt*) ($P<0,05$) e maior área sob curva de glicose ($P<0,05$), durante o TTI e o TTG, respectivamente (Figura 18).

A. Teste de tolerância à insulina (TTI)



B. Teste de tolerância à glicose (TTG)

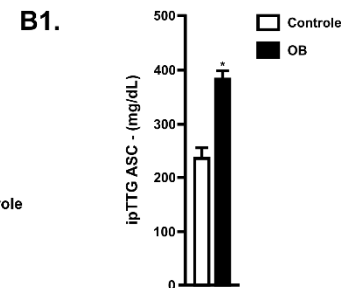
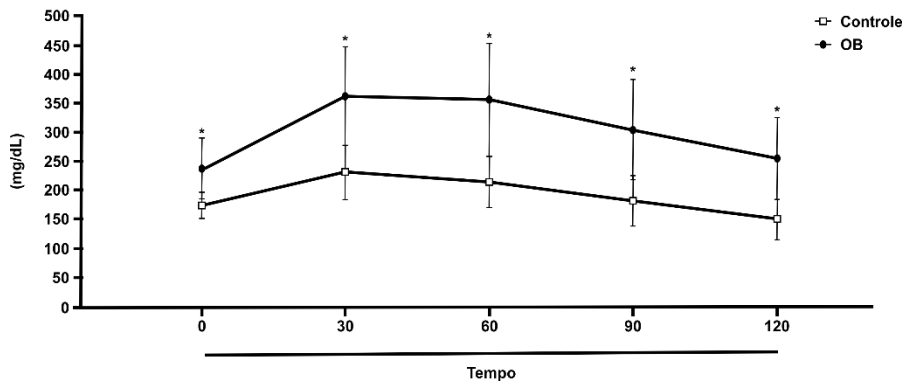


Figura 18. Teste de tolerância a insulina (TTI) e glicose (TTG). A – Níveis de glicose durante o TTI. A1 – Constância de decaimento de glicose calculada após a realização do TTI (*Kitt*) (% remoção de glicose/min). B – Níveis de glicose durante o GTT. B1 – Área sob a curva de glicose obtidos através do GTT (mg/dL). Controle (n=6), OB (n=30). ASC – Área sob a curva. Os gráficos de barras e de linhas representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * $P<0,05$ vs CTL, teste *t* de Student.

Após realização do TTI e TTG, os animais foram distribuídos nos grupos experimentais (OB, OB+EXE, OB+OL e OB+EXE+OL) por meio da distribuição em Z (*escore Z*), de modo que as médias iniciais de massa corporal/resistência à insulina foram homogêneas para todos os grupos (Figura 19). Os animais do grupo controle continuaram a receber dieta padrão durante todo o período experimental..

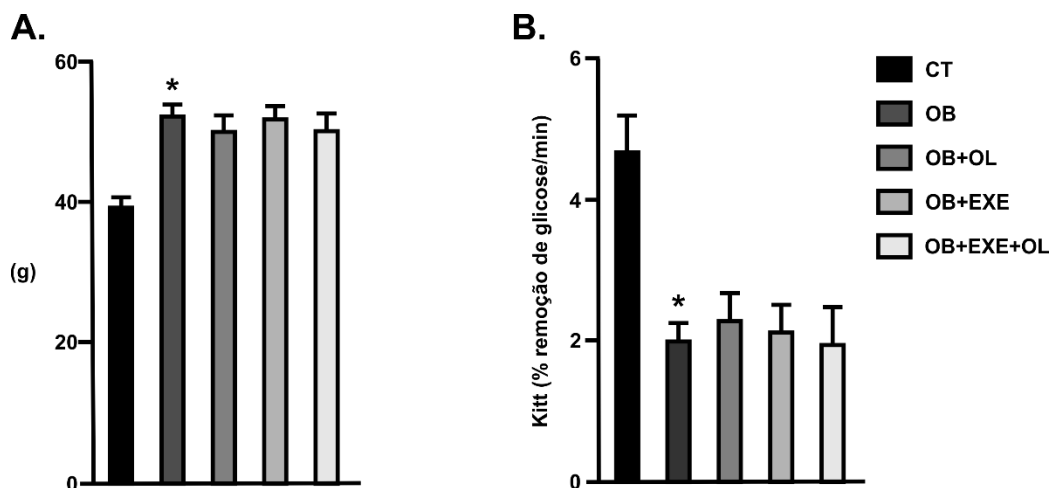


Figura 19. Médias iniciais de massa corporal/resistência à insulina após distribuição dos animais. Após 8 semanas de exposição a dieta hiperlipídica, os animais foram distribuídos nos grupos experimentais, de acordo com a distribuição em Z (*escore Z*). CT – animais expostos a dieta padrão (n=6); OB – animais expostos a dieta hiperlipídica (n=7); OB+OL – animais expostos ao tratamento com óleo de linhaça (n=8); OB+EXE – animais obesos expostos ao treinamento físico (n=7); OB+EXE+OL – animais obesos expostos ao treinamento físico e ao tratamento com óleo de linhaça (n=8). Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * $P < 0,05$ vs CTL, teste *t* de Student.

Os camundongos dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL passaram pelo período de adaptação em esteira rolante e realizaram o teste de carga incremental para determinação da P_{máx}. A Figura 20 apresenta os valores de média da P_{máx} e 60% da P_{máx} obtidos após o teste incremental. Após dois dias de repouso, o treinamento físico e o tratamento com óleo de linhaça foi iniciado.

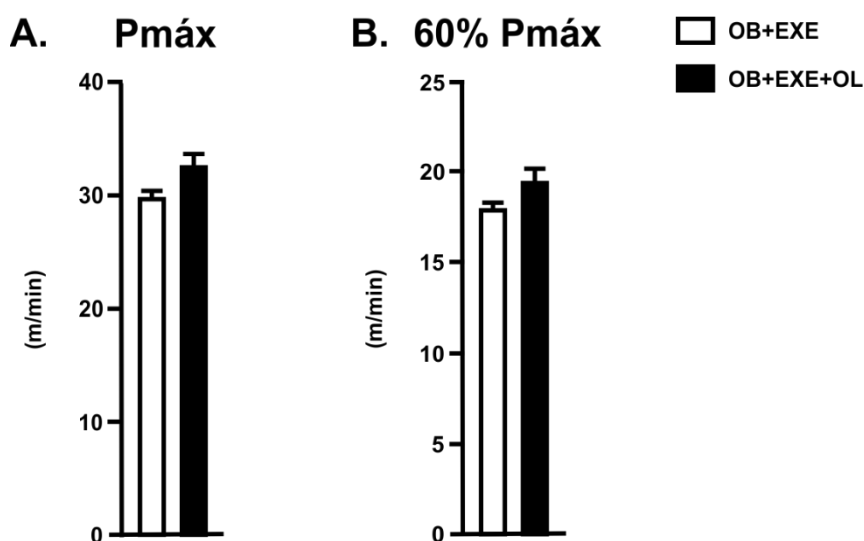


Figura 20. Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL. A – Pmáx atingida após realização do teste de carga incremental. B – Valores de 60% da Pmáx atingida no teste. Pmáx – potência máxima atingida no teste incremental; 60% Pmáx – refere-se ao cálculo de 60% da potência máxima, sendo esta a velocidade dos animais no protocolo de exercício físico crônico; OB – obeso; EXE – exercício físico agudo; OL – óleo de semente de linhaça. Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Ao final das quatro semanas do período de treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça, o teste de carga incremental foi novamente realizado. Os animais do grupo OB+EXE exibiram aumento na distância percorrida ($P > 0,05$) e na potência máxima ($P < 0,05$) quando comparado aos resultados obtidos durante o teste inicial. Com relação aos animais do grupo OB+EXE+OL, verificou-se aumento no tempo, distância percorrida e potência máxima atingida ($P < 0,05$) (Tabela 4 e Figura 21).

Tabela 4. Comparação dos valores atingidos no teste de carga incremental após o período de treinamento físico com o teste inicial

| | OB+EXE | | OB+EXE+OL | |
|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | Pré-treino | Pós-treino | Pré-treino | Pós-treino |
| Tempo (min) | 27,17 ± 3,76 | 29 ± 1,67 | 28,43 ± 3,26 | 32,57* ± 2,51 |
| Distância (m) | 462,1 ± 95,9 | 533,8* ± 55,9 | 498,4 ± 103,7 | 629* ± 90,16 |
| Pmáx (m/min) | 29,50 ± 2,26 | 31,71* ± 3,82 | 31,71 ± 3,40 | 35,57* ± 3,21 |

Tabela 4. Comparação dos valores atingidos no teste de carga incremental após o período de treinamento físico com o teste inicial. Após o período de treinamento físico, os animais dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL realizaram novamente o teste de carga incremental. OB+EXE – animais obesos expostos ao treinamento físico (n=7). OB+EXE+OL – animais obesos expostos ao treinamento físico e ao tratamento com óleo de linhaça (fonte de $\omega 3$ – 100 μ L/dia) (n=8). Dados referente a média e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. *P<0,05 vs pré-treinamento, teste *t* de Student.

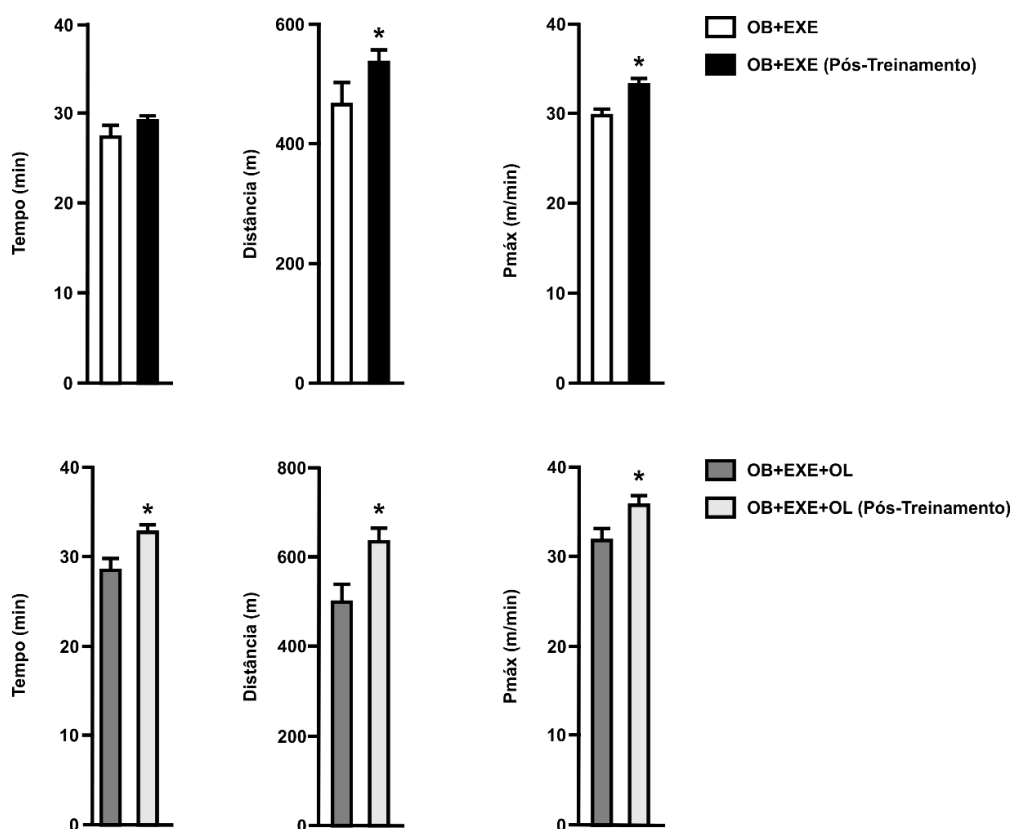


Figura 21. Comparação dos valores atingidos no teste de carga incremental após o período de treinamento físico com o teste inicial. Após o período de treinamento físico, os animais dos grupos OB+EXE (n=7) e OB+EXE+OL (n=8) realizaram novamente o teste de carga incremental. Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. *P<0,05 vs OB-EXE ou OB+EXE+OL, teste *t* de Student.

Com relação aos dados fisiológicos, os animais dos diferentes grupos experimentais (OB+OL, OB+EXE e OB+EXE+OL) não apresentaram alteração na massa corporal quando comparados aos animais obesos sedentários ($P>0,05$) (Figura 22 - A1). Entretanto, os animais do grupo OB+EXE+OL exibiram menor ganho de massa corporal ao final do período experimental quando comparado aos animais do grupo OB ($P<0,05$) (Figura 22 - A2).

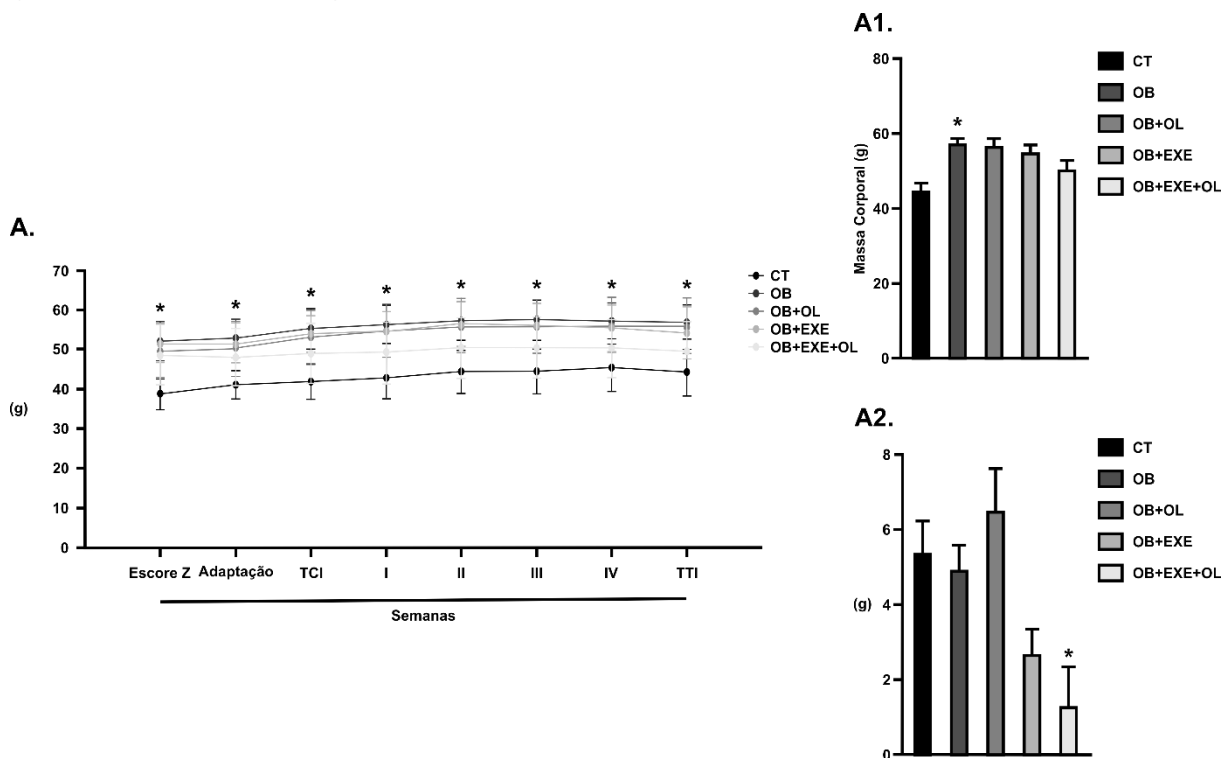


Figura 22. Variação da massa corporal após treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça. A – Variação da massa corporal a partir da distribuição dos animais nos grupos experimentais (Escore Z) e durante todo o período de treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça. A1 – Média da massa corporal dos grupos experimentais ao final de 4 semanas. A2 – Delta da massa corporal, massa corporal após 4 semanas de treinamento e tratamento com óleo de linhaça/massa corporal inicial. CT – animais expostos a dieta padrão ($n=6$); OB – animais expostos a dieta hiperlipídica ($n=7$); OB+OL – animais expostos ao tratamento com óleo de linhaça ($n=8$); OB+EXE – animais obesos expostos ao treinamento físico ($n=7$); OB+EXE+OL – animais obesos expostos ao treinamento físico e ao tratamento com óleo de linhaça ($n=8$). TCI – teste de carga incremental; TTI – teste de tolerância à insulina. Os gráficos de barras representam a média e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. A – * $P<0,05$ vs CT. A1 – * $P<0,05$ vs CT, teste t de Student. A2 – * $P<0,05$ vs OB, ANOVA.

Em seguida foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI) para verificar a homeostase da glicose e resistência à insulina após o treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça. Os valores obtidos mostraram que os animais dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL apresentaram redução da glicemia de jejum ($P<0,05$) e

maior taxa de decaimento de glicose (K_{itt}) ($P<0,05$) ao longo do teste quando comparados aos animais do grupo OB (Figura 23).

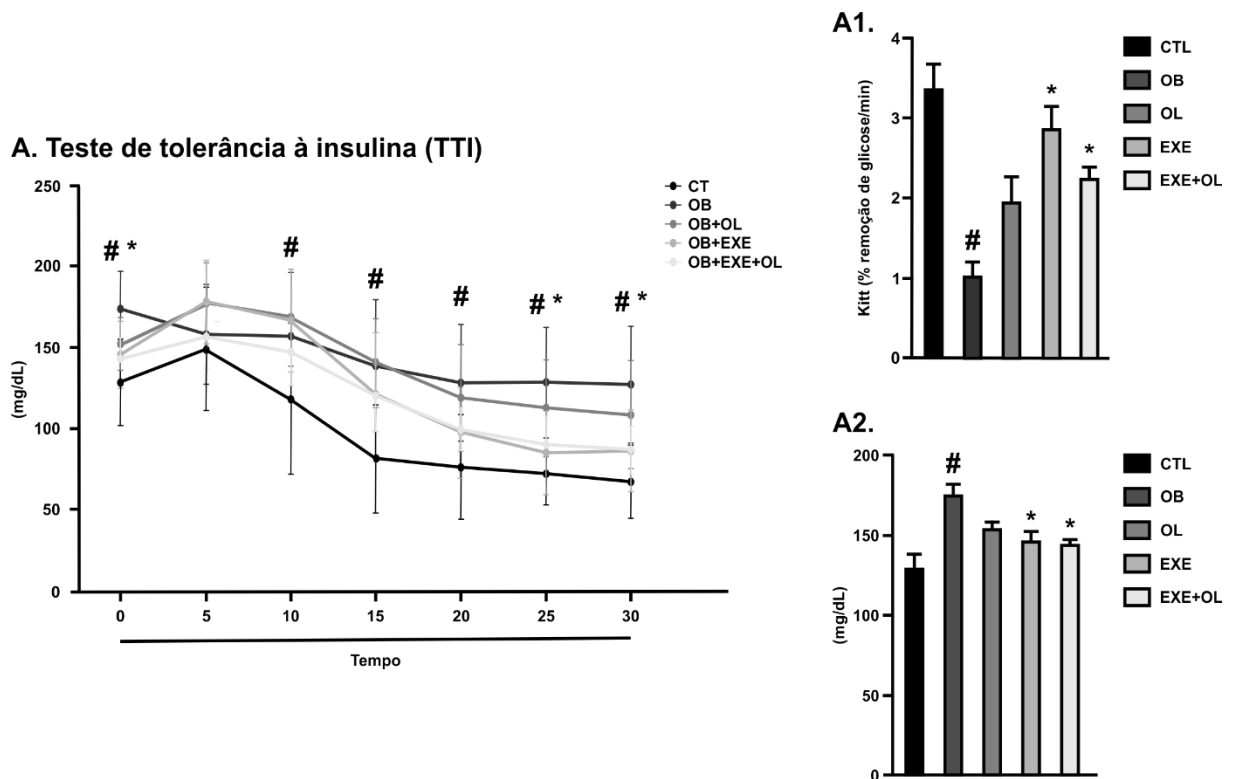


Figura 23. Teste de tolerância à insulina (TTI) após treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça. A – Níveis de glicose durante o TTI. A1 – Constância de decaimento de glicose calculado após o TTI (K_{itt}) (% remoção de glicose/min). A2 – Valores de glicemia de jejum dos animais. CT – animais expostos a dieta padrão ($n=6$); OB – animais expostos a dieta hiperlipídica ($n=7$); OB+OL – animais expostos ao tratamento com óleo de linhaça ($n=8$); OB+EXE – animais obesos expostos ao treinamento físico ($n=7$); OB+EXE+OL – animais obesos expostos ao treinamento físico e ao tratamento com óleo de linhaça ($n=8$). Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. A – # $P<0,05$ vs CTL, teste t de Student; * $P<0,05$ vs OB, ANOVA. A1 – # $P<0,05$ vs CTL, teste t de Student; * $P<0,05$ vs OB, ANOVA. A2 – # $P<0,05$ vs CT, teste t de Student; * # $P<0,05$ vs OB, ANOVA.

Ao final do período de treinamento físico e tratamento com $\omega 3$, os animais foram eutanasiados e os depósitos de gordura epididimal, mesentérica e retroperitoneal foram removidos e, posteriormente, pesados em balança analítica. Os animais do grupo OB apresentaram aumento em todos os depósitos de gordura extraídos em comparação ao grupo controle ($P<0,05$). Além disto, verificou-se menor conteúdo de gordura nos animais dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL quando comparado ao grupo de animais obesos ($P<0,05$) (Figura 24).

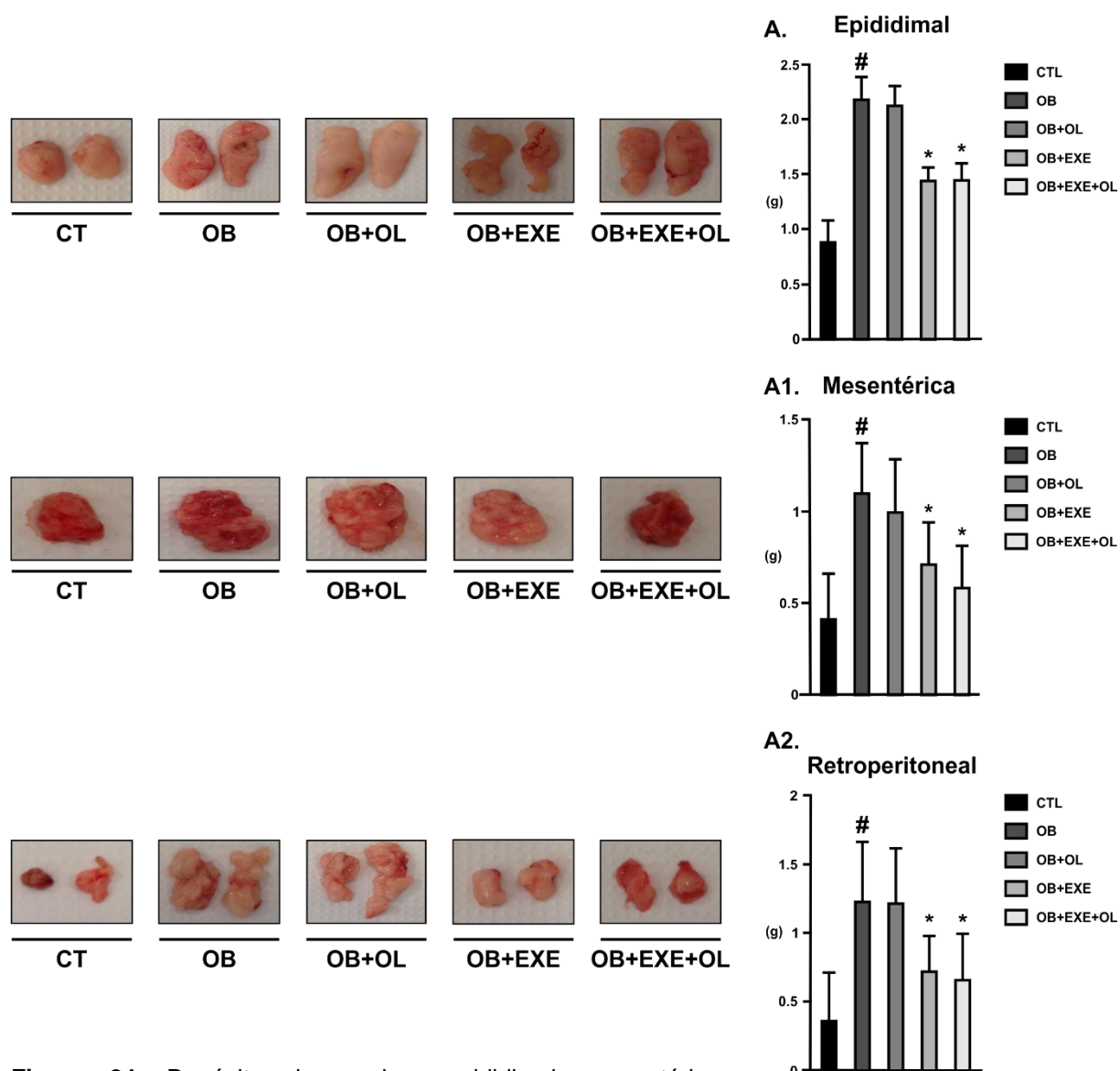


Figura 24. Depósito de gordura epididimal, mesentérica e retroperitoneal após treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça. A – Média de peso da gordura epididimal. A1 – Média de peso da gordura mesentérica. A2 – Média de peso da gordura retroperitoneal. CT – animais expostos a dieta padrão (n=6); OB – animais expostos a dieta hiperlipídica (n=7); OB+OL – animais expostos ao tratamento com óleo de linhaça (n=8); OB+EXE – animais obesos expostos ao treinamento físico (n=7); OB+EXE+OL – animais obesos expostos ao treinamento físico e ao tratamento com óleo de linhaça (n=8). Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. # $P < 0,05$ vs CTL, teste t de Student; * $P < 0,05$ vs OB, ANOVA.

Em seguida, deu-se início as análises moleculares para buscar compreender a relação do exercício físico crônico com a modulação da expressão do receptor GPR120. Para isso, o conteúdo proteico do receptor GPR120 nos diferentes grupos experimentais foi analisado utilizando a técnica de *immunoblotting*. Os animais

obesos sedentários apresentaram aumento na quantidade proteica de GPR120 em relação ao grupo controle, expostos à dieta padrão ($P<0,05$) (Figura 25).

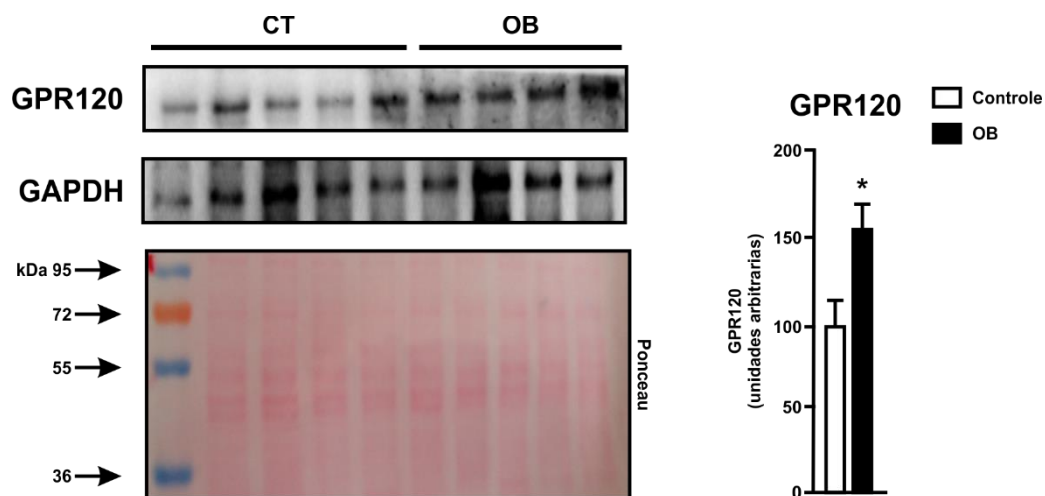


Figura 25. Conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Controle e OB. Extrato total de proteínas obtido do fígado de animais expostos a dieta padrão (Controle n=5) e hiperlipídica (Obesos tratados com soro fisiológico n=4) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar o conteúdo proteico de GPR120. Anticorpo específico para GPR120 foi utilizado para identificar a proteína. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * $P<0,05$ vs OB, teste *t* de Student.

Em seguida, os animais do grupo OB foram comparados aos demais grupos experimentais (OB+EXE, OB+OL e OB+EXE+OL). A Figura 26 mostra o conteúdo proteico de GPR120 nos animais dos grupos OB e OB+EXE. Os animais obesos exercitados apresentaram aumento do conteúdo proteico de GPR120 em relação aos obesos sedentários ($P<0,05$) (Figura 26).

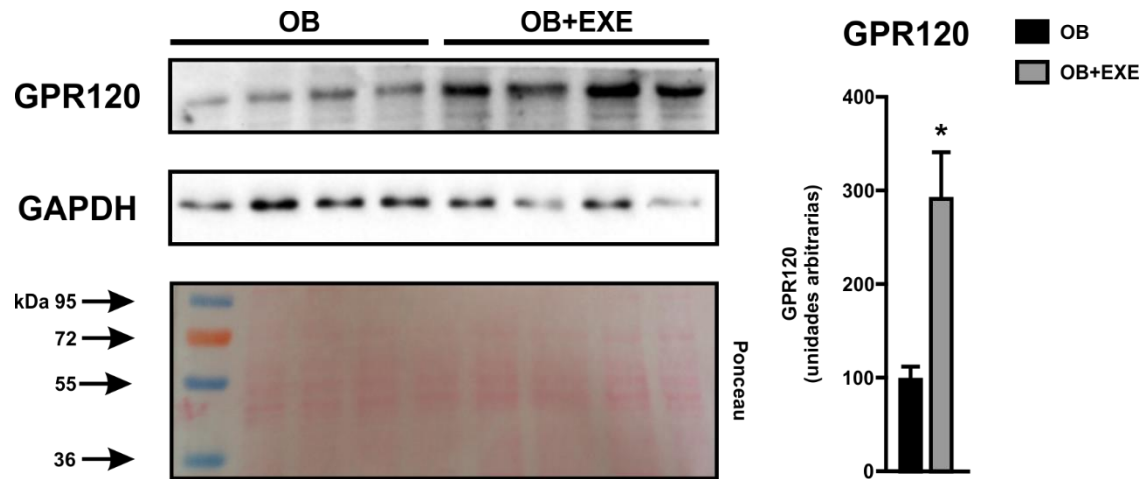


Figura 26. Conteúdo proteico de GPR120 nos grupos OB e OB+EXE. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais do grupo OB (Obesos tratados com soro fisiológico n=4) e OB+EXE (Obesos treinados n=4) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar o conteúdo proteico de GPR120. Anticorpo específico para GPR120 foi utilizado para identificar a proteína. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * P<0,05 vs OB, teste *t* de Student.

De maneira semelhante ao grupo obeso exercitado, os animais tratados com óleo de linhaça também apresentaram aumento na concentração proteica de GPR120 quando comparados ao grupo de animais obesos (P<0,05) (Figura 27).

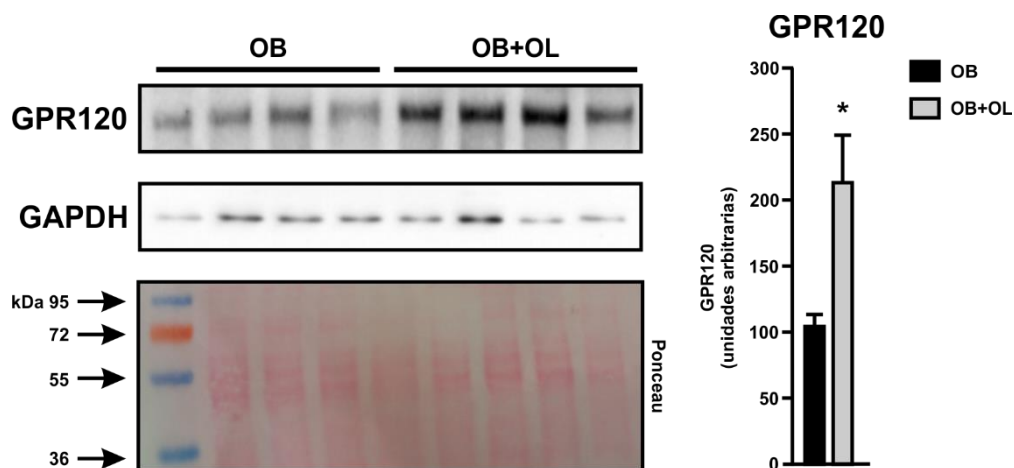


Figura 27. Conteúdo proteico de GPR120 nos grupos OB e OB+OL. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais do grupo OB (Obesos tratados com soro fisiológico n=4) e OB+OL (Obesos que receberam óleo de linhaça, via gavagem n=4) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar o conteúdo proteico de GPR120. Anticorpo específico para GPR120 foi utilizado para identificar a proteína. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * P<0,05 vs OB, teste *t* de Student.

Entretanto, o grupo de animais exercitados e expostos ao tratamento com óleo de linhaça não apresentou aumento no conteúdo proteico de GPR120 em relação ao grupo obeso sedentário ($P>0,05$) (Figura 28).

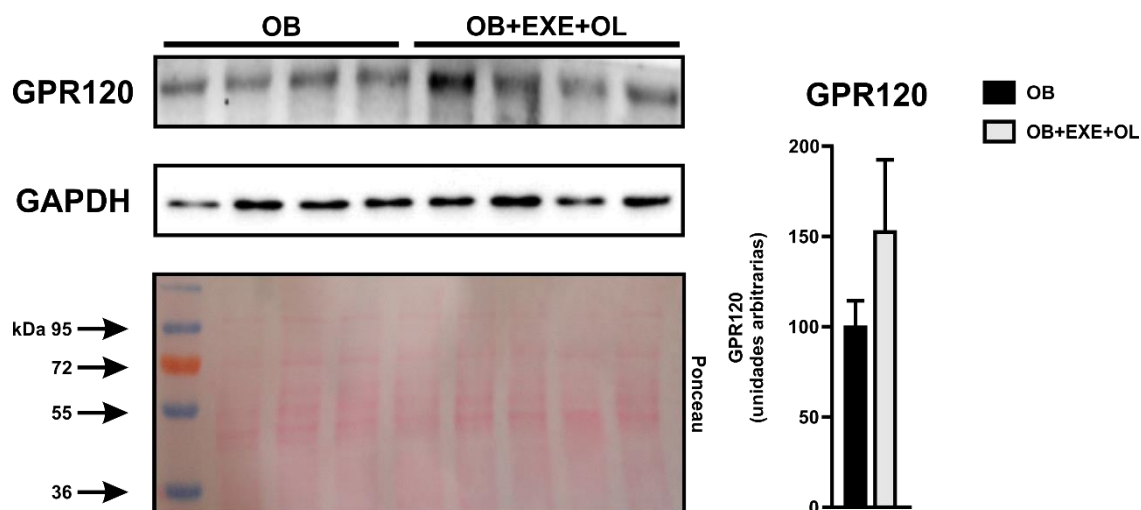


Figura 28. Conteúdo proteico de GPR120 nos grupos OB e OB+EXE+OL. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais do grupo OB (Obesos tratados com soro fisiológico $n=4$) e OB+EXE+OL (Obesos treinados que receberam óleo de linhaça, via gavagem $n=4$) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar o conteúdo proteico de GPR120. Anticorpo específico para GPR120 foi utilizado para identificar a proteína. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Posteriormente, verificou-se a atividade e o conteúdo das proteínas envolvidas com a propagação do sinal inflamatório. Os animais dos diferentes grupos experimentais não apresentaram diferença na atividade da proteína TAK-1 ($P>0,05$) (Figura 29).

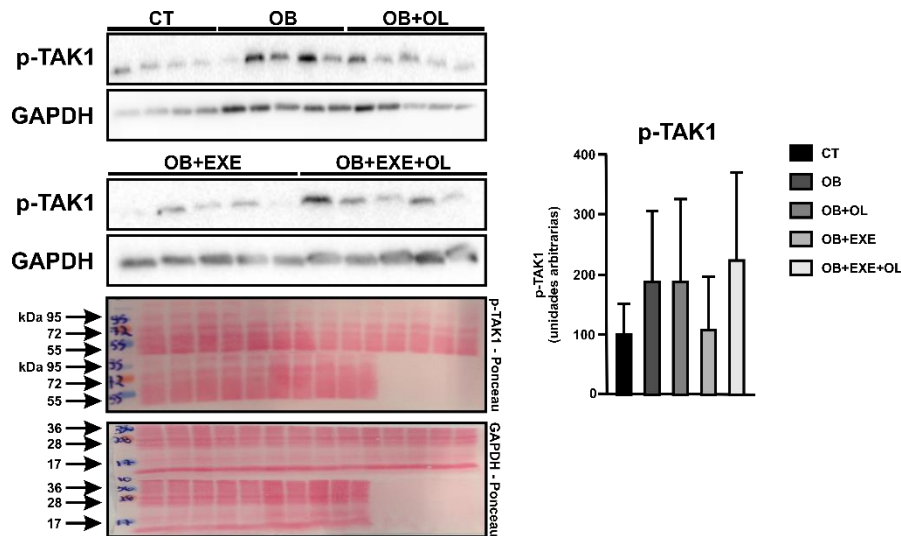


Figura 29. Fosforilação da proteína TAK1. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos CT (n=4), OB (n=5), OB+OL (n=5), OB+EXE (n=5) e OB+EXE+OL (n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar a atividade da TAK1. Anticorpos específicos para p-TAK1 e GAPDH foram utilizados para identificar as proteínas. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Com relação a fosforilação da proteína I κ B- α , verificou-se aumento no grupo de animais obesos sedentários quando comparados ao grupo controle ($P<0,05$). Por outro lado, os animais que participaram do treinamento físico apresentaram redução na fosforilação desta proteína em comparação aos animais obesos ($P<0,05$) (Figura 30).

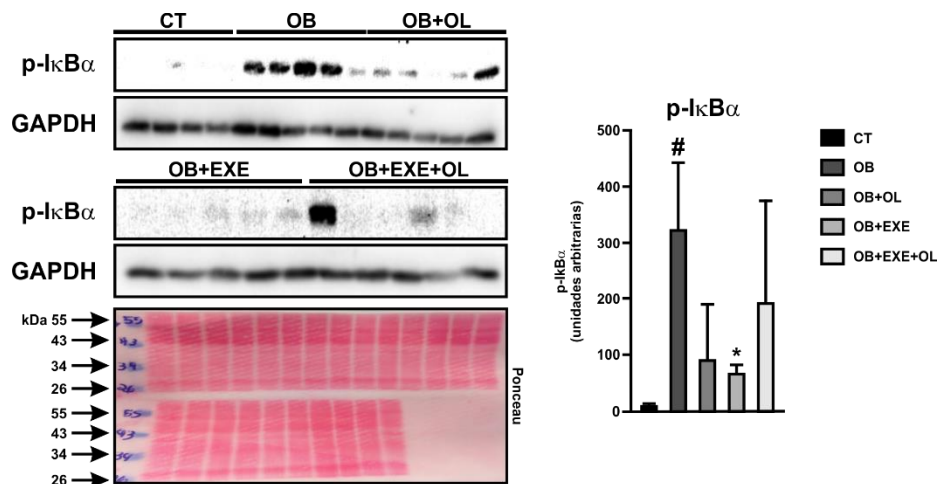


Figura 30. Fosforilação da proteína I κ B- α . Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos CT (n=4), OB (n=5), OB+OL (n=5), OB+EXE (n=5) e OB+EXE+OL (n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar a atividade do I κ B- α . Anticorpos específicos para p-I κ B- α e GAPDH foram utilizados para identificar as proteínas. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. [#] $P<0,05$ vs CT, teste *t* de Student; ^{*} $P<0,05$ vs OB, ANOVA.

Desse modo, a próxima proteína analisada foi a JNK. Como esperado, os camundongos expostos a dieta hiperlipídica apresentaram aumento na fosforilação de JNK ($P<0,05$). Entretanto, verificou-se redução na fosforilação desta proteína nos grupos OB+EXE, OB+OL e OB+EXE+OL em relação aos animais obesos ($P<0,05$) (Figura 31).

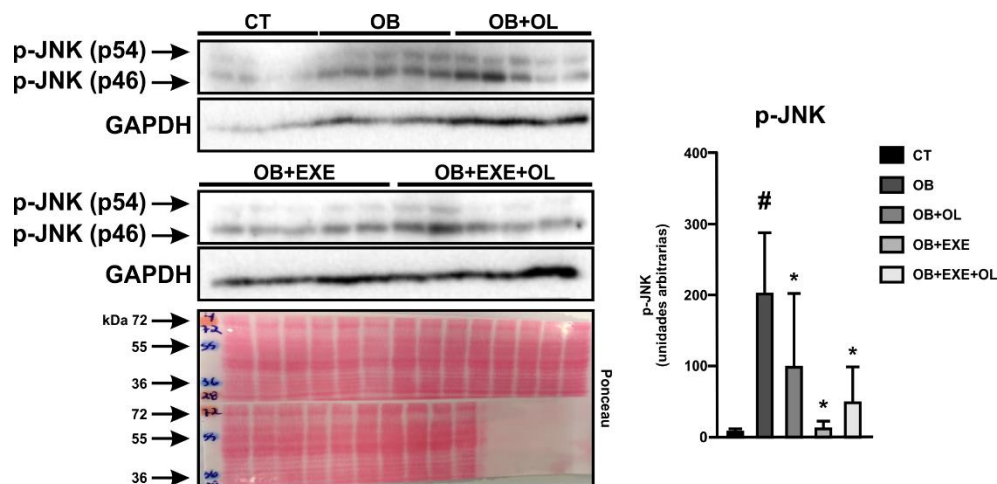


Figura 31. Fosforilação da proteína JNK. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos CT (n=4), OB (n=5), OB+OL (n=5), OB+EXE (n=5) e OB+EXE+OL (n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar a atividade de JNK. Anticorpos específicos para p-JNK e GAPDH foram utilizados para identificar as proteínas. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. [#] $P<0,05$ vs CT, teste *t* de Student; ^{*} $P<0,05$ vs OB, ANOVA.

Em seguida, analisou-se o conteúdo proteico de TNF- α nos diferentes grupos experimentais. A exposição a dieta rica em gordura resultou em aumento no conteúdo proteico de TNF- α ($P<0,05$). No entanto, os grupos OB+EXE, OB+OL e OB+EXE+OL exibiram redução no conteúdo desta proteína quando comparados ao grupo OB ($P<0,05$) (Figura 32).

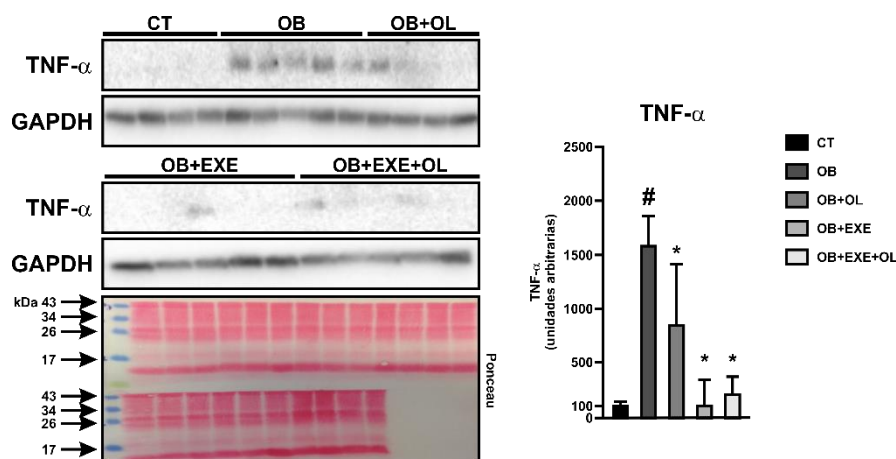


Figura 32. Conteúdo proteico de TNF- α . Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos CT (n=4), OB (n=5), OB+OL (n=4), OB+EXE (n=5) e OB+EXE+OL (n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar o conteúdo proteico de TNF- α . Anticorpos específicos para TNF- α e GAPDH foram utilizados para identificar as proteínas. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. [#] P<0,05 vs CT, teste *t* de Student; ^{*} P<0,05 vs OB, ANOVA.

A Figura 33 mostra os resultados da concentração proteica de IL-1 β após o período de treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça. Os animais do grupo OB apresentaram aumento no conteúdo proteico de IL-1 β quando comparado ao grupo controle (P<0,05). Por outro lado, os animais dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL apresentaram redução na quantidade proteica de IL-1 β em relação aos animais expostos a dieta rica em gordura (P<0,05) (Figura 33).

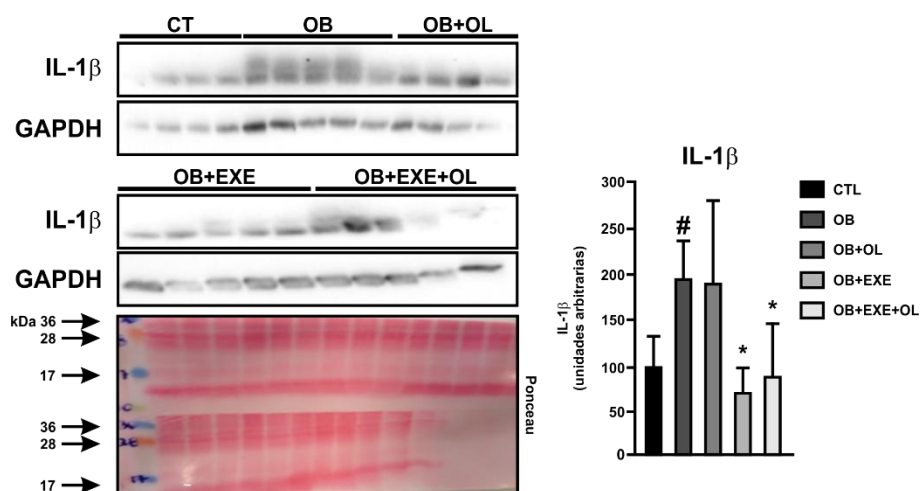


Figura 33. Conteúdo proteico de IL-1 β . Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos CT (n=4), OB (n=5), OB+OL (n=4), OB+EXE (n=5) e OB+EXE+OL (n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar o conteúdo proteico de IL-1 β . Anticorpos específicos para IL-1 β e GAPDH foram utilizados para identificar as proteínas. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. [#] P<0,05 vs CT, teste *t* de Student; ^{*} P<0,05 vs OB, ANOVA.

Posteriormente, verificou-se o conteúdo da proteína anti-inflamatória IL-10. Os animais obesos exibiram aumento na quantidade proteica de IL-10 ($P<0,05$). Porém, nenhuma diferença foi encontrada na quantidade proteica de IL-10 nos outros grupos experimentais ($P>0,05$) (Figura 34).

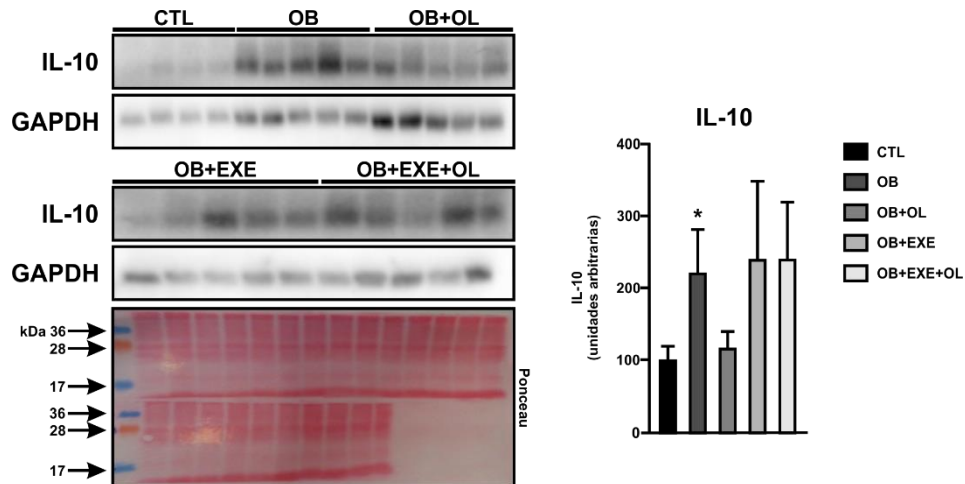


Figura 34. Conteúdo proteico de IL-10. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos CT (n=4), OB (n=5), OB+OL (n=5), OB+EXE (n=5) e OB+EXE+OL (n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para o avaliar conteúdo proteico de IL-10. Anticorpos específicos para IL-10 e GAPDH foram utilizados para identificar as proteínas. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * $P<0,05$ vs CT, teste *t* de Student.

Desse modo, a próxima etapa realizada foi a análise da atividade das proteínas envolvidas com a via da insulina e com a síntese de glicogênio. Previamente a extração do tecido hepático, realizou-se a infusão de 100 μ L de insulina ou soro fisiológico (placebo), via porta-hepática, para estímulo das proteínas da via da insulina e glicogênio. A Figura 35 apresenta os resultados da fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β nos grupos de animais estimulados e não estimulados com insulina. Os animais do grupo controle estimulados com insulina (CT - positivo) apresentaram aumento na fosforilação da proteína Akt quando comparados ao grupo não estimulado ($P<0,05$). Além disso, os camundongos obesos estimulados com insulina exibiram menor fosforilação da proteína Akt comparado ao grupo controle positivo ($P<0,05$). Entretanto, nenhuma diferença foi observada na fosforilação da proteína GSK-3 β ($P>0,05$) (Figura 35).

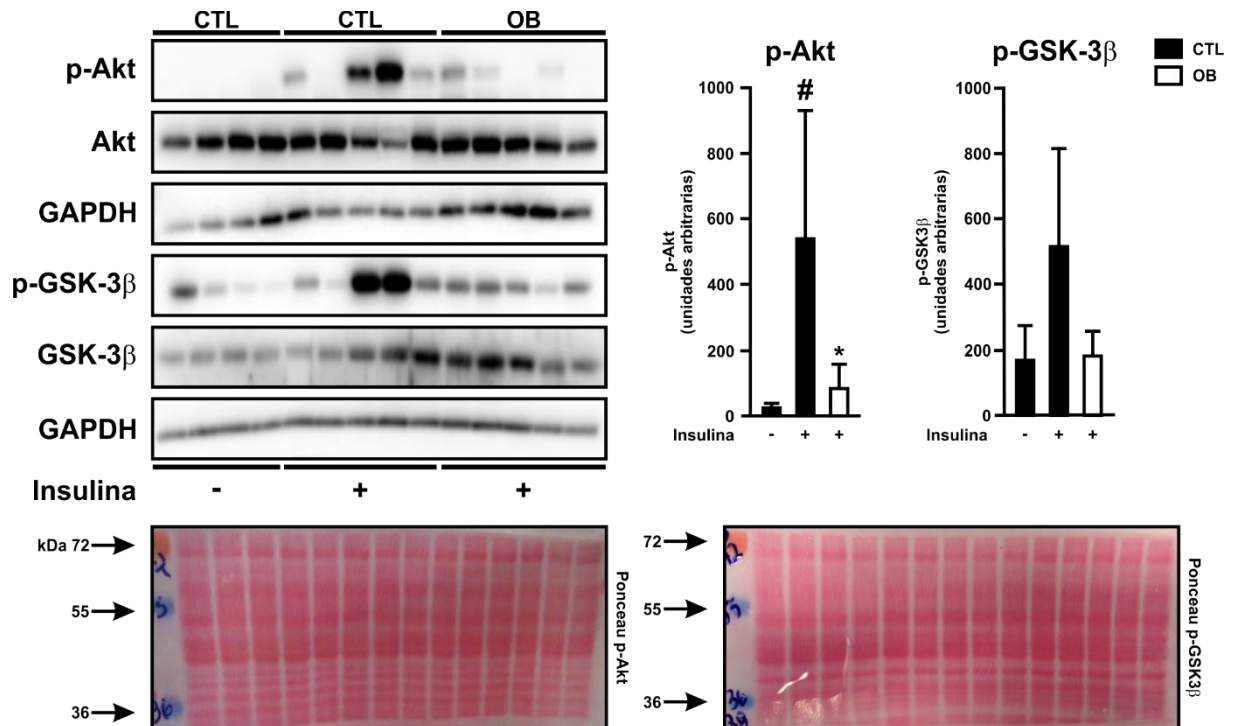


Figura 35. Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3β após estímulo com insulina. Camundongos Swiss foram anestesiados e tratados agudamente através da veia porta hepática com solução salina (100 µL) (-) ou insulina (100 µL) (+). Após 30', fragmentos do tecido hepático foram extraídos para a realização dos experimentos. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos CT (-) (n=4), CT (+) (n=5) e OB (+) (n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar a atividade das proteínas Akt e GSK-3β. Anticorpos específicos para p-Akt, Akt, p-GSK-3β, GSK-3β e GAPDH foram utilizados para identificar as proteínas. Os gráficos de barras representam as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. # $P < 0,05$ CT (-) vs CT (+), teste *t* de Student; * $P < 0,05$ CT (+) vs OB (+), ANOVA.

Posteriormente, o grupo de animais obesos estimulados com insulina (OB +) foi comparado aos outros grupos experimentais. Os animais que participaram do treinamento físico e do tratamento com óleo de linhaça não apresentaram aumento na fosforilação da proteína Akt em relação aos animais obesos ($P > 0,05$) (Figura 36).

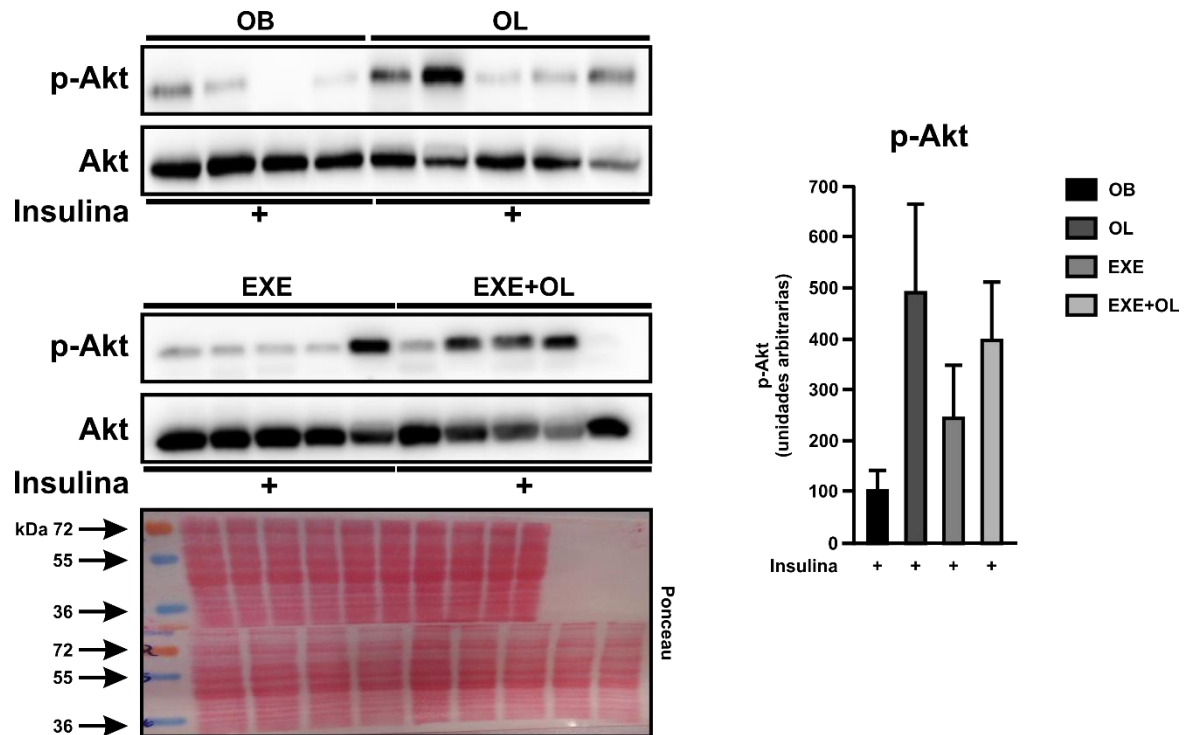


Figura 36. Fosforilação da proteína Akt. Camundongos Swiss foram anestesiados e tratados agudamente através da veia porta hepática com solução de insulina (100 μ L) (+). Após 30', fragmentos do tecido hepático foram extraídos para a realização dos experimentos. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos OB (obesos sedentários, n=4), OB+OL (obesos + tratamento com óleo de linhaça, via gavagem, n=5), OB+EXE (obesos treinados, n=5) e OB+EXE+OL (obesos treinados + tratamento com óleo de linhaça, n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar a atividade da proteína Akt. Anticorpos específicos para p-Akt e Akt foram utilizados para identificar as proteínas. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

De maneira semelhante à proteína Akt, não foi verificado aumento na fosforilação de GSK-3 β nos diversos grupos experimentais (OB+OL, OB+EXE e OB+EXE+OL) após estímulo com insulina, em comparação aos animais obesos ($P>0,05$) (Figura 37).

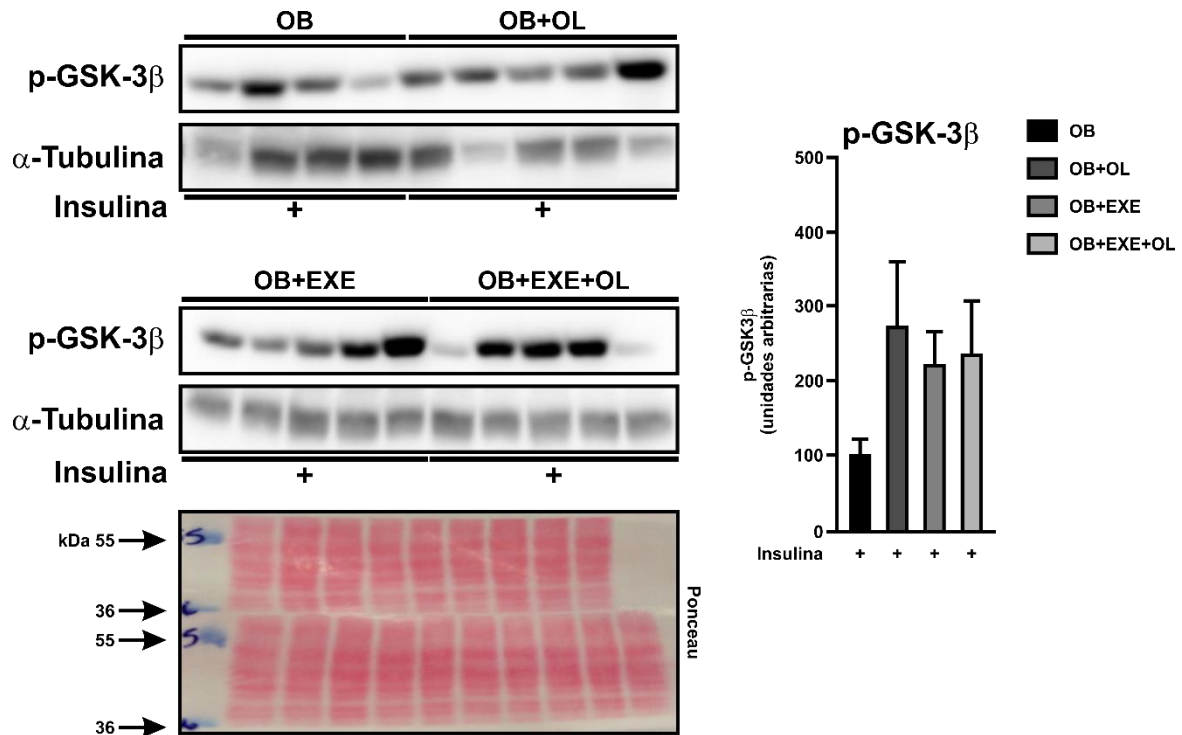


Figura 37. Fosforilação da proteína GSK-3 β . Camundongos *Swiss* foram anestesiados e tratados agudamente através da veia porta hepática com solução de insulina (100 μ L) (+). Após 30', fragmentos do tecido hepático foram extraídos para a realização dos experimentos. Extrato total de proteínas obtido do fígado dos animais dos grupos OB (obesos sedentários, n=4), OB+OL (obesos + tratamento com óleo de linhaça, via gavagem, n=5), OB+EXE (obesos treinados, n=5) e OB+EXE+OL (obesos treinados + tratamento com óleo de linhaça, n=5) foram utilizados em experimentos de *immunoblotting* (IB), para avaliar a atividade da proteína GSK-3 β . Anticorpos específicos para p-GSK-3 β e α -Tubulina foram utilizados para identificar as proteínas. O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Por fim, o conteúdo hepático de glicogênio foi analisado. Os animais expostos a dieta rica em gordura apresentaram aumento no conteúdo de glicogênio quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). Entretanto, o treinamento físico e o tratamento com óleo de linhaça não foram capazes de aumentar o conteúdo hepático de glicogênio em comparação aos camundongos obesos ($P > 0,05$) (Figura 38).

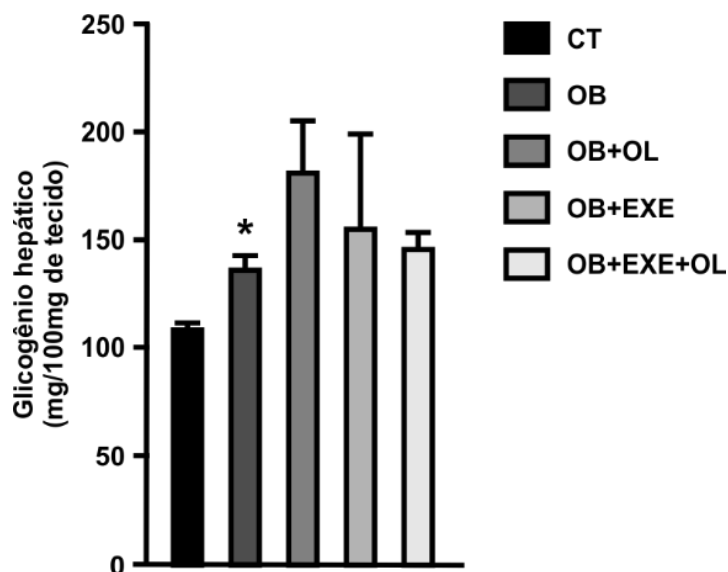


Figura 38. Conteúdo hepático de glicogênio após treinamento físico e tratamento com óleo de linhaça. CT – camundongos expostos a dieta padrão (n=5); OB – obesos sedentários (n=5); OB+OL – obesos expostos ao tratamento com óleo de linhaça (n=5); OB+EXE – obesos treinados (n=5); OB+EXE+OL – obesos treinados expostos ao tratamento com óleo de linhaça (n=5). O gráfico de barras representa as médias e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental. * $P < 0,05$ vs CT, teste *t* de Student.

6. DISCUSSÃO:

Atualmente a obesidade é considerada doença fora do controle com índices de prevalência crescentes no mundo todo^{9,10}. Além disso, a obesidade traz consigo um conjunto de doenças associadas como DM2, hipertensão, dislipidemias e aterosclerose, doenças neurodegenerativas e alguns tipos de câncer^{4,6,15,16}.

Devido ao preocupante cenário atual e futuro, alternativas terapêuticas não-medicamentosas vêm sendo intensamente investigadas. Desse modo, diversos estudos na literatura descreveram o papel de certos nutrientes, como os ácidos graxos $\omega 3$, e do exercício físico em desacoplar o processo inflamatório proveniente dos receptores *Toll* e de citocinas, muito evidente na obesidade^{50,56}. Além disso, parece que tais terapêuticas são capazes de auxiliar a retomada da homeostase glicêmica em indivíduos dismetabólicos, aumentando a captação de glicose e a sensibilidade a insulina^{50,59,60}. Portanto, a união dessas duas terapêuticas (nutrição e exercício físico) poderia contribuir para estruturação de interessantes abordagens antiobesogênicas construídas a partir de observações moleculares.

No presente estudo, investigou-se a hipótese de que o exercício físico poderia modular a expressão do receptor de ácidos graxos insaturados, GPR120. No primeiro momento, camundongos magros foram utilizados para buscar compreender os efeitos

do exercício físico aeróbio agudo sobre o padrão de expressão hepática do GPR120, bem como, identificar o tempo após a realização do exercício no qual a expressão desse receptor estivesse em seu pico. Posteriormente, o tempo pico de expressão para o GPR120 após o exercício físico agudo seria aplicado em animais obesos em conjunto com o óleo de semente de linhaça, fonte oleosa de ω 3. Entretanto, os dados obtidos mostraram que o exercício físico agudo não foi capaz de aumentar a expressão gênica e o conteúdo proteico deste receptor em camundongos magros após a realização do protocolo de exercício físico agudo (Figura 7 e 8).

Com relação a expressão do GPR120, estudos na literatura mostraram que o receptor está presente em diversos tecidos como pulmão, intestino, especialmente na região do cólon, pâncreas, tecido adiposo, hipotálamo, papilas gustativas, macrófagos e glândulas adrenais⁷⁴⁻⁷⁸. No tocante ao fígado, o GPR120 é expresso nos hepatócitos e também nas células de Kupffer, no qual está envolvido com efeito protetor a essas células e ao próprio tecido hepático^{51,54,55}.

No entanto, poucos trabalhos buscaram descrever a relação entre o exercício físico e o receptor GPR120. Em estudo recente, Fujitani *et al.* (2014)⁷⁹ analisaram a deleção de dois receptores de ácidos graxos, o CD36 e o GPR120, sobre o metabolismo energético de camundongos durante o exercício físico em esteira rolante. A deleção do receptor CD36 resultou em redução na oxidação de ácidos graxos e aumento na utilização de glicose como substrato energético durante o exercício físico. Por outro lado, a deleção do GPR120 não levou a alterações no metabolismo energético durante o exercício físico em esteira⁷⁹. Desse modo, os resultados obtidos indicam que o exercício físico agudo não está envolvido com a modulação da expressão hepática do receptor GPR120 em camundongos magros.

Anteriormente ao início do tratamento com óleo de linhaça, a composição e porcentagem dos ácidos graxos presentes no óleo foi analisada por cromatografia. Os dados obtidos após a análise mostraram que o óleo de linhaça utilizado durante o desenvolvimento do projeto apresentava 52,3% do ácido α -linolênico, fonte de ômega-3 (C18:3) (Tabela 3).

Após realização da cromatografia do óleo de linhaça, deu-se início as investigações sobre o conteúdo hepático de glicogênio após 24 horas da realização do

protocolo de exercício físico agudo e dos respectivos tratamentos: soro, glicose, óleo de linhaça e óleo de linhaça + glicose.

Resultados obtidos em testes pilotos indicavam que o exercício físico agudo seria capaz de aumentar a expressão hepática de GPR120, e que o pico de expressão desse receptor aconteceria após 24 horas da realização do exercício. Além disso, o aumento na expressão de GPR120 poderia contribuir com a síntese de glicogênio neste tecido. Como dito anteriormente, os ácidos graxos ômega-3 ligam-se ao GPR120, que dispara sinalização intracelular através das subunidades da proteína G, em especial a $G\alpha_q/11$ ^{50,80}. A $G\alpha_q/11$ parece ser capaz de ligar-se fisicamente a subunidade $p110\alpha$ da proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q), ativando-a⁸⁰. Tal sinalização poderia culminar na fosforilação da proteína Akt, que exerce diversas funções intracelulares, dentre elas, a fosforilação e, consequentemente, inibição da proteína GSK-3 β ^{60,61}. Quando fosforilada, a GSK-3 β deixa de inibir a proteína glicogênio sintase (GS) que então, pode exercer suas funções na síntese de glicogênio^{60,61}. Outro possível mecanismo que poderia levar a ativação da Akt envolve a atividade da proteína Fosfolipase-C β (PLC β). A $G\alpha_q/11$ é capaz de ativar a PLC β resultando em aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), esta mobilização de Ca^{2+} promove a ativação da proteína PI3q que poderá levar a fosforilação da Akt⁸¹.

Desse modo, os ácidos graxos da família do ômega-3 poderiam aumentar a atividade de proteínas envolvidas com síntese de glicogênio através do receptor GPR120 e, consequentemente, na presença de glicose, potencializar a síntese de glicogênio hepático.

Contudo, tal observação não foi verificada em nossos experimentos. Os resultados obtidos mostraram que o exercício físico agudo em conjunto com o óleo de linhaça e glicose não foram capazes de aumentar o conteúdo de glicogênio hepático em camundongos magros (Figura 11).

Com relação a atividade das proteínas envolvidas com a síntese de glicogênio, verificou-se que o grupo de animais exercitados apresentou aumento na fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β em relação ao grupo controle (Figura 12). Outros estudos na literatura mostraram que o exercício físico é capaz de aumentar a atividade das proteínas da via da insulina e, dessa forma, contribuir para a síntese de glicogênio⁸²⁻⁸⁵. Entretanto, quando os animais do grupo Exe+Soro foram comparados aos outros

grupos de animais exercitados que receberam os diferentes tratamentos (óleo de linhaça, glicose e óleo de linhaça+glicose), não foi verificado aumento na fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β (Figuras 13-15).

Tais resultados corroboram os encontrados durante as análises de expressão gênica e do conteúdo proteico de GPR120, no qual não foi encontrado tempo determinado para o pico de expressão para o receptor da família dos ácidos graxos ômega-3. Portanto, o exercício físico agudo não foi capaz de aumentar a expressão de GPR120 em camundongos magros e, conseqüentemente, não levou a potencialização na síntese de glicogênio hepático após os tratamentos com óleo de linhaça, via gavagem e glicose.

Uma das justificativas para este resultado pode estar relacionado ao tempo de espera após a administração do óleo de linhaça. Dados anteriores mostraram que não ocorreu ativação do GPR120 após 3 horas da administração do óleo de semente de linhaça, via gavagem (Figura 9). Portanto, pode ser que a sinalização através do GPR120 que resultaria no aumento da atividade das proteínas envolvidas com a síntese de glicogênio não tenha ocorrido ou ainda estivesse em propagação e, por este motivo, nenhuma alteração no conteúdo hepático de glicogênio foi observada. Uma alternativa seria realizar a extração do tecido hepático após um período mais longo da realização da gavagem com o óleo de linhaça.

Desse modo, a próxima etapa do trabalho foi realizada em modelo de animais obesos. Após 8 semanas de exposição a dieta hiperlipídica, os animais tornaram-se obesos e resistentes à insulina (Figura 16-18). Tal diferença na massa corporal dos animais começou a ser evidenciada a partir da segunda semana de exposição a dieta DIO (Figura 16). Tais dados corroboram os apresentados por Cintra *et al.* (2012)⁵² e Ropelle *et al.* (2010)⁵⁷ que utilizaram o mesmo modelo dietético pelo mesmo período de tempo, mostrando que a exposição a dieta rica em gordura foi capaz de induzir obesidade e resistência à insulina.

Em seguida, deu-se início ao treinamento físico e as intervenções com óleo de linhaça, com objetivo de verificar o papel do exercício físico crônico sobre a modulação hepática do GPR120, bem como, a sua relevância na homeostase glicêmica de camundongos obesos.

Ao final do período de treinamento físico e do tratamento com o óleo de semente de linhaça, o teste de carga incremental foi novamente realizado. Os resultados obtidos mostraram que os animais dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL apresentaram aumento no tempo para atingir a exaustão, distância percorrida e P_{máx} quando comparados aos resultados do teste inicial (Tabela 4 – Figura 21). Com relação a homeostase da glicose, os grupos OB+EXE e OB+EXE+OL manifestaram melhora na taxa de decaimento de glicose durante o teste de tolerância à insulina (TTI) (Figura 23). Ainda, os animais expostos ao treinamento físico associado ou não ao óleo de semente de linhaça exibiram redução nos depósitos de gordura epididimal, mesentérica e retroperitoneal (Figura 24).

Com relação aos dados obtidos durante o TTI, alguns estudos mostraram que a substituição em 10% de gordura saturada por óleo de semente linhaça ou em 27% por óleo de peixe^{50,51}, são capazes de promover melhora na sensibilidade à insulina em animais obesos. Além disso, o exercício físico realizado tanto de maneira aguda como crônica, também é capaz de aumentar a taxa de remoção de glicose durante o teste de tolerância à insulina^{57,59}. Ainda, diversos estudos na literatura mostraram que o aumento no volume do tecido adiposo contribui para redução da sensibilidade à insulina. Entretanto, a diminuição do volume dos depósitos de gordura promove redução nos marcadores inflamatórios e aumento na sensibilidade à insulina^{87,88}. Desse modo, a redução nos depósitos de gordura epididimal, mesentérica e retroperitoneal podem ter contribuído para a melhora na sensibilidade à insulina encontrado nos animais que participaram do treinamento físico associado ou não ao tratamento com óleo de semente de linhaça.

Posteriormente, deu-se início às análises moleculares para investigar a quantidade proteica de GPR120 após intervenções de exercício físico crônico e óleo de linhaça, para isso, o conteúdo proteico de GPR120 foi analisado nos diferentes grupos experimentais. Os animais obesos apresentaram aumento na concentração proteica de GPR120 quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 25). Alguns estudos na literatura mostraram que a exposição à dieta rica em gordura é capaz de aumentar a expressão de GPR120 em diversos tecidos como intestino, estômago, músculo, coração, tecido adiposo subcutâneo e visceral, tanto em modelos de animais experimentais como em seres humanos^{89–92}. Por outro lado, estudo realizado por Rodriguez-Pacheco *et al.* (2014)⁹³ verificou redução na expressão gênica e proteica de GPR120 no tecido adiposo

visceral e subcutâneo de obesos mórbidos quando comparados a indivíduos magros⁹³. No tocante ao fígado, Cornall *et al.* (2011)⁸⁹ verificaram que animais expostos a dieta hiperlipídica não apresentaram aumento na expressão gênica de GPR120 quando comparados ao grupo controle.

Além disso, em estudo recente, Chen *et al.* (2015)⁹⁴ descreveram um possível fator de transcrição para o GPR120, conhecido como C/EBP β . Com auxílio de técnicas de biologia molecular, os autores mostraram que a proteína C/EBP β é capaz de migrar ao núcleo e se ligar a região promotora do GPR120, iniciando sua transcrição. Ainda, animais expostos a dieta hiperlipídica apresentaram aumento na expressão gênica e proteica de C/EBP β e GPR120, bem como, maior associação do C/EBP β com a região promotora do receptor GPR120 quando comparados aos animais expostos a dieta padrão⁹⁴. Desse modo, tais dados sugerem que a dieta rica em gordura parece ser capaz de regular a expressão de GPR120 de maneira tecido-específica. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o padrão de expressão do GPR120, bem como, os fatores que poderiam atuar controlando a expressão deste receptor.

Em seguida, os animais do grupo OB foram comparados aos outros grupos experimentais (OB+EXE, OB+OL e OB+EXE+OL). Quanto ao conteúdo proteico de GPR120, foi verificado aumento no grupo de animais exercitados em relação ao grupo de animais obesos sedentários (Figura 26). Além disso, os animais do grupo OB+OL também apresentaram aumento no conteúdo proteico de GPR120 quando comparados ao grupo OB (Figura 27).

Desse modo, parece que o exercício físico crônico é capaz de modular o conteúdo proteico de GPR120, o que torna a prática de exercícios físicos uma terapêutica ainda mais atrativa para tratamento da obesidade e comorbidades, uma vez que a sinalização disparada por este receptor é capaz de atenuar a cascata inflamatória proveniente dos receptores *Toll* e de citocinas⁵⁰. Entretanto, a literatura ainda é desprovida de trabalhos que procuram relacionar o exercício físico com o receptor GPR120.

Diversos trabalhos mostraram que as fibras musculares, sob atividade física, são capazes de secretar citocinas que podem atuar de maneira endócrina em tecidos como adiposo, pâncreas, endotélio e fígado^{95–99}. Tais citocinas são chamadas de miocinas⁹⁹. Uma das hipóteses iniciais adotadas pelo nosso grupo com relação ao aumento do conteúdo proteico de GPR120 nos animais exercitados, envolvia a atuação

de miocinas, que estariam sendo secretadas pelas fibras musculares recrutadas durante o exercício físico aeróbio em esteira rolante, e desta forma, tal molécula atuaria sinalizando para o aumento de GPR120 no tecido hepático. No entanto, essa hipótese perdeu força com a recente descrição do C/EBP β como possível fator de transcrição para o GPR120.

Com relação ao aumento no conteúdo proteico de GPR120 encontrado no grupos de animais tratados com óleo de linhaça, outros estudos investigaram a influência dos ácidos graxos da família do ω 3 sobre a expressão do GPR120, tanto em modelo de animais experimentais como em seres humanos^{54,100}. Em estudo recente, Cheshmehkani *et al* (2015)¹⁰⁰ mostraram que exposição a dieta suplementada com óleo de linhaça e de peixe, por sete semanas, foi capaz de aumentar a expressão de GPR120 no intestino de ratos *Sprague-Dawley*¹⁰⁰. Ademais, Nobili *et al* (2014)⁵⁴ estudaram o efeito do tratamento com ácido docosahexaenóico (DHA), por dezoito meses, em crianças diagnosticadas com esteatose-hepática não alcoólica (NAFLD) e verificaram que o tratamento com DHA foi capaz de aumentar a expressão de GPR120 bem como, reduzir a atividade do fator de transcrição NF- κ B e a presença de macrófagos de caráter pró-inflamatório no tecido hepático⁵⁴.

Neste ínterim, Ichimura *et al* (2012)⁹⁰ mostraram que camundongos *knockout* para o GPR120 apresentam maior facilidade para o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina, e que o surgimento de uma mutação não-sinónima (p.R270H) no exon deste receptor poderia aumentar a propensão para a obesidade em populações europeias⁹⁰. Portanto, parece que os ácidos graxos da família do ω 3 são capazes de modular a expressão do GPR120.

Entretanto, quando os animais do grupo EXE+OL foram comparados ao grupo de animais obesos, não foi verificado aumento no conteúdo proteico de GPR120 (Figura 28). Desse modo, não foi encontrado efeito aditivo do treinamento físico aeróbio associado ao óleo de linhaça.

Com relação a propagação do sinal inflamatório, o óleo de semente de linhaça, o treinamento físico e as duas intervenções associadas mostraram-se capazes de reduzir a atividade e o conteúdo das proteínas envolvidas com a propagação deste sinal em relação ao grupo de animais obesos sedentários. Outros estudos na literatura também mostraram que os ácidos graxos da família do ômega-3 e o exercício físico são

capazes de diminuir a atividade das proteínas envolvidas com o processo inflamatório^{48-50,53}. Entretanto, os dados obtidos indicam que o exercício físico associado ou não ao óleo de linhaça parece ter uma ação mais eficaz em reduzir a inflamação, contribuindo para o aumento na sensibilidade à insulina nestes animais (Figuras 23 e 30-33).

Posteriormente, foi analisado a atividade das proteínas envolvidas com a via da insulina, bem como o conteúdo hepático de glicogênio nos diferentes grupos experimentais. Os animais dos grupos OB+EXE, OB+OL e OB+EXE+OL não apresentaram aumento na fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β em relação ao grupo obeso sedentário (Figuras 36 e 37). Além disso, os animais obesos apresentaram aumento do conteúdo hepático de glicogênio quando comparados aos animais controle. Porém, o exercício físico e o óleo de linhaça não foram capazes de potencializar a síntese de glicogênio hepático (Figura 38).

7. CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos indicam que o exercício físico agudo não é capaz de modular a expressão gênica ou o conteúdo proteico de GPR120 em camundongos magros. Além disso, a associação do exercício físico agudo com óleo de linhaça, na presença de glicose, não resultou em alterações no conteúdo hepático de glicogênio. Entretanto, mais experimentos fazem-se necessários para compreender o efeito do exercício físico agudo associado ao tratamento com óleo de linhaça sobre a síntese de glicogênio hepático.

Por outro lado, tanto o exercício físico crônico quanto o tratamento com óleo de linhaça foram capazes de aumentar o conteúdo proteico de GPR120 no fígado de animais obesos. Portanto, este pode ser mais um mecanismo pelo qual o exercício físico contribui para melhora do quadro de resistência à insulina encontrado em animais obesos, uma vez que a sinalização intracelular disparada pelo GPR120 é capaz de desacoplar o processo inflamatório.

Com relação a propagação da inflamação, o exercício físico crônico associado ou não ao óleo de linhaça parece ser mais eficiente em reduzir a atividade das proteínas envolvidas com o processo inflamatório. Tais resultados corroboram as observações encontradas após a realização do teste de tolerância à insulina, no qual os animais expostos ao treinamento físico associado ou não ao óleo de semente de linhaça apresentaram melhora na sensibilidade à insulina.

Desse modo, os resultados apresentados nessa dissertação sobre a possível atuação do exercício físico na modulação do receptor GPR120 podem contribuir para elaboração de novas estratégias antiobesogênicas, modeladas a partir de observações moleculares, associadas à terapêutica nutricional específica.

REFERÊNCIAS

1. Peter, G., Mark, H., Paul, Z. & Terrence, F. Losing the War Against Obesity: The Need for a Developmental Perspective. *Sci Transl Med* **3**, 1–4 (2011).
2. Malik, V. S., Willett, W. C. & Hu, F. B. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 13–27 (2013).
3. Hill, J. O. Understanding and addressing the epidemic of obesity: An energy balance perspective. *Endocr. Rev.* **27**, 750–761 (2006).
4. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–6 (2006).
5. Semenkovich, C. F. Review series Insulin resistance and atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **116**, 1813–1822 (2006).
6. Van Gaal, L. F., Mertens, I. L. & De Block, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* **444**, 875–880 (2006).
7. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–7 (2006).
8. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
9. Scully, T. Society at large. *Nature* **508**, 50–51 (2014).
10. Kopelman, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635–643 (2000).
11. Hossain, P., Kavar, B. & El Nahas, M. Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *N. Engl. J. Med.* **356**, 213–215 (2007).
12. Organização Mundial da Saúde. BMI classification. (2013). Disponível em: <<http://apps.who.int/bmi/index.jsp>>. Acesso em: 15 de outubro de 2015.
13. Internacional Diabetes Federation. Prevalence Estimates of Diabetes Mellitus (DM). (2010). Disponível em: <<http://www.idf.org/content/saca.>>. Acesso em: 15 de outubro de 2015.

14. De Felice, F. G. & Ferreira, S. T. Inflammation, Defective Insulin Signaling, and Mitochondrial Dysfunction as Common Molecular Denominators Connecting Type 2 Diabetes to Alzheimer Disease. *Diabetes* **63**, 2262–2272 (2014).
15. Spielman, L. J., Little, J. P. & Klegeris, A. Inflammation and insulin/IGF-1 resistance as the possible link between obesity and neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* **273**, 8–21 (2014).
16. Renehan, A. G., Zwahlen, M. & Egger, M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 484–498 (2015).
17. Sartori-Cintra, A. R., Aikawa, P. & Cintra, D. E. C. Obesity versus osteoarthritis: beyond the mechanical overload. *Einstein (São Paulo)* **12**, 374–379 (2014).
18. Leiria, L. O. S., Martins, M. a. & Saad, M. J. a. Obesity and asthma: beyond TH2 inflammation. *Metabolism* **64**, 172–181 (2015).
19. Young, T., Peppard, P. E. & Taheri, S. Excess weight and sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol.* **99**, 1592–1599 (1985).
20. Spritzer, P. M., Lecke, S. B., Satler, F. & Morsch, D. M. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction* **149**, R219–R227 (2015).
21. Fabbrini, E. & Magkos, F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients* **7**, 4995–5019 (2015).
22. Fabbrini, E., Sullivan, S. & Klein, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* **51**, 679–689 (2010).
23. Rinella, M. E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Jama* **313**, 2263 (2015).
24. Kim, J. K. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab.* **4**, 415–417 (2006).
25. Shi, H. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 3015–3025 (2006).

26. Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H. & Hwang, D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* **276**, 16683–16689 (2001).
27. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
28. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
29. Leclerc, V. & Reichhart, J.-M. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Rev.* **198**, 59–71 (2004).
30. Johnson, A. M. F. & Olefsky, J. M. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell* **152**, 673–684 (2013).
31. De Souza, C. T. *et al.* Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192–4199 (2005).
32. Lin, S., Thomas, T. C., Storlien, L. H. & Huang, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int. J. Obes.* **24**, 639–646 (2000).
33. Scarpace, P. J. & Zhang, Y. Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**, R493–R500 (2009).
34. Pauli, J. R., Cintra, D. E., Souza, C. T. de & Ropelle, E. R. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **53**, 399–408 (2009).
35. Lancaster, G. I. & Febbraio, M. A. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. *Trends Immunol.* **35**, 262–269 (2014).
36. Lumeng, C. N. & Saltiel, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *Life Sci.* **121**, 2111–2117 (2011).
37. Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806 (2001).

38. Sabio, G. *et al.* A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance. *Science* **322**, 1539–1543 (2008).
39. Zhang, H. *et al.* Bariatric surgery reduces visceral adipose inflammation and improves endothelial function in type 2 diabetic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2063–2069 (2011).
40. Araújo, E. P. *et al.* Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* **148**, 5991–5997 (2007).
41. Gao, Z. & Ye, J. Why do anti-inflammatory therapies fail to improve insulin sensitivity? *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 182–188 (2012).
42. Scott, L. J. Tofacitinib: A review of its use in adult patients with rheumatoid arthritis. *Drugs* **73**, 857–874 (2013).
43. Stanley, T. L. *et al.* TNF α antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 146–150 (2011).
44. Gisondi, P. & Girolomoni, G. Biologic therapies in psoriasis: A new therapeutic approach. *Autoimmun. Rev.* **6**, 515–519 (2007).
45. Noe, A., Howard, C., Thuren, T., Taylor, A. & Skerjanec, A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of single-dose canakinumab in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Ther.* **36**, 1625–1637 (2014).
46. Knowler, W. C. *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* **346**, 393–403 (2002).
47. Hamman, R. F. *et al.* Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes. *Diabetes Care* **29**, 2102–7 (2006).
48. Dyerberg, J. & Bang, H. O. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* **2**, 433–435 (1979).
49. Davidson, M. H. *et al.* Efficacy and Tolerability of Adding Prescription Omega-3 Fatty Acids 4 g/d to Simvastatin 40 mg/d in Hypertriglyceridemic Patients: An 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin. Ther.* **29**, 1354–1367 (2007).

50. Oh, D. Y. *et al.* GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* **142**, 687–698 (2010).
51. Oliveira, V. *et al.* Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology* **156**, en.2014–1880 (2015).
52. Cintra, D. E. *et al.* Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One* **7**, (2012).
53. Morari, J. *et al.* The role of proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. *Metabolism*. **59**, 215–23 (2010).
54. Nobili, V. *et al.* Role of docosahexaenoic acid treatment in improving liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One* **9**, e88005 (2014).
55. Raptis, D. A. *et al.* GPR120 on Kupffer cells mediates hepatoprotective effects of ω 3-fatty acids. *J. Hepatol.* **60**, 625–632 (2014).
56. Pauli, J. R. *et al.* Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J. Physiol.* **586**, 659–671 (2008).
57. Ropelle, E. R. *et al.* IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. *PLoS Biol.* **8**, 31–32 (2010).
58. Hawley, J. A. & Lessard, S. J. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiol.* **192**, 127–135 (2008).
59. Ropelle, E. R. *et al.* Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1 α pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J. Physiol.* **587**, 2069–2076 (2009).
60. Pauli, L. S. *et al.* Exercise training decreases MAPK phosphatase-3 expression and suppresses hepatic gluconeogenesis in obese mice. *J. Physiol.* **6**, 1325–1340 (2014).

61. Marinho, R. *et al.* Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J. Cell. Physiol.* **227**, 2917–2926 (2012).
62. De Souza, C. T. *et al.* Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4 α pathway in insulin resistant mice. *J. Physiol.* **588**, 2239–2253 (2010).
63. Ropelle, E. R. *et al.* Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J. Physiol.* **577**, 997–1007 (2006).
64. Chiarreotto-Ropelle, E. C. *et al.* Acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein level and improves insulin and leptin signaling in obese rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E649–59 (2013).
65. de Moura, L. P. *et al.* Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. *Immun. Ageing* **10**, 8 (2013).
66. Ferreira, J. C. B. *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 760–765 (2007).
67. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993).
68. Hartman, L. & Lago, R. C. . Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pr.* **22**, 475–477 (1973).
69. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
70. Tsukumo, D. M. L. D. *et al.* Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1986–1998 (2007).
71. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

72. Sjorgreem B, Nordenskjold DT, Holmgren H, W. J. Bertrag zur kentnis des le berrhythmik. *Pfluger Arch Gesante Physiol Menschen Tiere*. **240**, (1938).
73. DuBois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356 (1956).
74. Mizuta, K. *et al.* Novel identification of the free fatty acid receptor FFAR1 that promotes contraction in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **81**, ajplung.00041.2015 (2015).
75. Gotoh, C. *et al.* The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 591–597 (2007).
76. Matsumura, S. *et al.* Colocalization of GPR120 with phospholipase-C β 2 and α -gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci. Lett.* **450**, 186–190 (2009).
77. Im, D. S. Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **4**, 1–8 (2015).
78. Ulven, T. & Christiansen, E. Dietary Fatty Acids and Their Potential for Controlling Metabolic Diseases Through Activation of FFA4/GPR120. *Annu. Rev. Nutr.* **35**, 239–63 (2015).
79. Fujitani, M. *et al.* CD36, but not GPR120, is required for efficient fatty acid utilization during endurance exercise. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1871–8 (2014).
80. Imamura, T. *et al.* G alpha-q/11 protein plays a key role in insulin-induced glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6765–6774 (1999).
81. Mo, X., Wei, H., Peng, J. & Tao, Y. Free Fatty Acid Receptor GPR120 and Pathogenesis of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* **114**, (2013).
82. Marinho, R. *et al.* Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and protein kinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. *Einstein (São Paulo)* **12**, 82–89 (2014).

83. Bruss, M. D., Arias, E. B., Lienhard, G. E. & Cartee, G. D. Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes* **54**, 41–50 (2005).
84. Peres, S. B. *et al.* Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS / PI3-kinase / Akt pathway. *J Appl Physiol* **98**, 1037–1043 (2005).
85. Ropelle, E. R. *et al.* Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes* **62**, 466–470 (2013).
86. Cintra, D. E. *et al.* Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One* **7**, e30571 (2012).
87. Koppaka, S. *et al.* Reduced adipose tissue macrophage content is associated with improved insulin sensitivity in thiazolidinedione-treated diabetic humans. *Diabetes* **62**, 1843–1854 (2013).
88. Ortega Martinez de Victoria, E. *et al.* Macrophage Content in Subcutaneous Adipose Tissue. *Diabetes* **58**, 385–393 (2009).
89. Cornall, L. M., Mathai, M. L., Hryciw, D. H. & McAinch, A. J. Diet-induced obesity up-regulates the abundance of GPR43 and GPR120 in a tissue specific manner. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **28**, 949–958 (2011).
90. Ichimura, A. *et al.* Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* **483**, 350–354 (2012).
91. Paulsen, S. J. *et al.* Expression of the Fatty Acid Receptor GPR120 in the Gut of Diet-Induced-Obese Rats and Its Role in GLP-1 Secretion. *PLoS One* **9**, e88227 (2014).
92. Widmayer, P. *et al.* High fat feeding affects the number of GPR120 cells and enteroendocrine cells in the mouse stomach. *Front. Physiol.* **6**, 1–8 (2015).
93. Rodriguez-Pacheco, F. *et al.* Effects of obesity/fatty acids on the expression of GPR120. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**, 1852–1860 (2014).

94. Chen, K., Zhou, J., Zhang, F., Zhang, F. & Zhang, R. Transcription factor C / EBP β promotes the transcription of the porcine GPR120 gene. *J Mol Endocrinol.* **56(2)**, 91–100 (2015).
95. Pal, M., Febbraio, M. A. & Whitham, M. From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 331–339 (2014).
96. Allen, T. L., Whitham, M. & Febbraio, M. a. IL-6 muscles in on the gut and pancreas to enhance insulin secretion. *Cell Metab.* **15**, 8–9 (2012).
97. Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S. & Pedersen, B. K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J. Physiol.* **508 (Pt 3)**, 949–53 (1998).
98. Lancaster, G. I. & Febbraio, M. A. Skeletal muscle: not simply an organ for locomotion and energy storage. *J Physiol* **587**, 509–510 (2009).
99. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. a. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 457–465 (2012).
100. Cheshmehkani, A. *et al.* Fish oil and flax seed oil supplemented diets increase FFAR4 expression in the rat colon. *Inflamm. Res.* **64**, 809–815 (2015).

Anexo 1: Artigo

Omega-3 Fattys-Acids and Exercise Training Control GPR120 Expression in Liver from Obese and Diabetic Mice: Potential Antiinflammatory Activities

Guilherme Pedron Formigari, ²⁻³ Rafael Calais Gaspar, ²⁻⁴ Mariana Pereira Bessi, ²⁻³ Marcella Datilo, ²⁻³ Camilla Bertuzzo Veiga, ²⁻³ Adelino Sanches Ramos da Silva, ⁵ José Rodrigo Pauli, ²⁻⁴ Dennys Esper Cintra^{2-3*}.

²Biotechnology Center – School of Applied Sciences – State University of Campinas; ³Laboratory of Nutritional Genomics – State University of Campinas; ⁴Laboratory of Molecular Biology of Exercise – State University of Campinas; ⁵ School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo

Abstract

Background: GPR120 is an omega-3 fatty acids receptor with antiinflamatory properties. However, little is known about the expression of this receptor in the hepatic tissue.

Objective: We investigated the modulation of the expression of GPR120 receptor in the liver of lean mice after an acute aerobic exercise session. In addition, GPR120 expression was analyzed in obese animals after an exercise training protocol together or not with a flax seed oil treatment, as well as its impact on the signaling pathway of insulin and inflammation.

Methods: Swiss mice were subjected to an acute aerobic exercise protocol, wherein fragments of the hepatic tissue were removed for analysis of GPR120 expression. After this, the mice were exposed to a standard or high fat diet. Subsequent to the development of obesity the mice were subjected to a aerobic exercise training, a treatment with flax seed oil or the two interventions at the same time for another four

weeks. At the end of the period, fragments of the liver were extracted for analysis of the activity and concentration of GPR120 and proteins involved in pathways of omega-3, insulin and inflammation.

Results: The acute aerobic exercise did not show increase in gene expression and protein content of GPR120. Nevertheless, the aerobic exercise training and the treatment with flax seed were able to increase the protein content of GPR120 ($P < 0.05$). Furthermore, the mice subjected only to the exercise training and the ones exposed to both interventions showed decrease in some inflammatory proteins ($P < 0.05$).

Conclusions: The acute aerobic exercise is not involved in the modulation of GPR120 expression in lean mice. However, aerobic exercise training and flax seed oil seem to be able to increase the protein content of GPR120 in obese animals as well as reduce the activity of proteins involved in the inflammatory signal. Therefore, the possible role of physical exercise on the modulation of GPR120 can contribute to the development of new strategies against obesity.

Keywords: nutrigenomics, exercise, GPR120, obesity, insulin resistance.

¹ Supported by funds from São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant 14/15258-6.

³ Current address: Laboratory Nutritional Genomics – LabGeN, School of Applied Sciences – Limeira – Brazil.

⁴ Current address: Laboratory of Molecular Biology of Exercise – LaBMEx, School of Applied Sciences – Limeira – Brazil.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: dcintra@yahoo.com.

Introduction

The current high consumption of saturated fat associated with sedentary lifestyle contribute to the increase in obesity prevalence (1, 2). Furthermore, obesity can facilitate the development of obesity-related disorders including insulin resistance and type 2 diabetes (3, 4). Obesity is associated with low-grade, chronic inflammatory state that increases the production of several inflammatory cytokines and impairs the insulin pathway ⁸.

In the liver, insulin resistance increases the glucose production in postprandial situations and decreases the synthesis of glycogen (5, 6). The high production of glucose by the liver stimulates the secretion of insulin by the pancreatic beta cells leading to a hyperinsulinemic state ⁸. In the skeletal muscle, insulin resistance can reduce the uptake of glucose, amino acids and the synthesis of glycogen ³⁵. Moreover, this state can decrease the ability of insulin to inhibit lipolysis in adipose tissue increasing the concentration of free fatty acids in the bloodstream ¹⁰².

Therefore, therapeutic alternatives have been investigated and the use of unsaturated fatty acids such as omega 3 (ω 3) seems to be able to reduce the risk of developing chronic diseases due to its antiinflammatory characteristics (9, 10). Omega-3 fatty acids can inhibit cyclooxygenase pathway ¹⁰³ and reduce inflammatory cytokine levels ¹⁰⁴. However, these mechanisms are poorly understood.

Recently, five new G protein-coupled receptors (GPR40, GPR41, GPR43, GPR84, and GPR120) which are activated by free fatty acids were reported ¹⁰⁵. GPR41 and GPR43 are activated by short-chain fatty acids (SCFAs) ¹⁰⁶ and GPR84 is considered a receptor for medium-chain fatty acids ¹⁰⁷. Subsequently, GPR40 and GPR120 can be activated by long-chain fatty acids (LCFAs) (16, 17).

In this context, GPR120 has received considerable attention due to its ability to disrupt inflammatory process through β -arrestina-2 that reduces TAK-1 and NF- κ B activation. Furthermore, GPR120 seems to be able to improve insulin sensitive in the adipose tissue ⁵⁰. Nevertheless, the mechanisms responsible for regulating GPR120 expression are still not completely elucidated. On the other hand, several lines of evidence suggest that physical exercise can regulate the expression of inflammatory markers reducing the propagation of the inflammatory process, hepatic glucose production, and improve insulin pathway ^{57,59,109}.

Therefore, the association of the nutrition and physical exercise could contribute to the structuring of interesting approaches against obesity. However, to our knowledge, no studies have yet investigated the role of physical exercise in the modulation of GPR120 in the liver.

In the present study, we investigated the role of acute physical exercise in the gene expression and protein content of GPR120 in the hepatic tissue of lean mice. In addition, we analyzed the protein content of GPR120 in obese mice subjected to a physical exercise training protocol and a flax seed oil treatment, as well as their impact on the signaling pathway of insulin and in the propagation of the inflammatory process.

Methods

Animal protocol: All experiments were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the University of Campinas Ethical Committee (ID: 3512-1). Male, 4-week old, Swiss mice were obtained from UNICAMP Breeding Center. The mice were housed in plastic individual cages at 21 °C \pm 2 with a 12-h light/dark cycle. The animals were anesthetized and killed with high levels of anesthesia.

Diets and experimental designs: To carry out the acute aerobic exercise protocol the animals were divided into the following groups: sedentary (C); extraction of the hepatic tissue immediately after the physical exercise session (0h); extraction after 8 hours of exercise session (8h); extraction after 16 hours (16h); extraction after 24 hours (24h) and extraction after 48 hours of the exercise session (48h).

The exercise training began after the development of obesity. The mice were allowed access to either standard rodent chow (CT) or a high-fat diet (HF) for eight weeks. The diets were prepared in accordance with the guidelines of the American Institute of Nutrition (AIN-93G) ⁶⁷. The HF diet was modified to contain 35% of saturated fat (Table 1) ⁵². Thereafter, mice on CT remained on that diet while mice on HF were distributed in the following groups: maintained on HF plus 100 μ L of saline, via gavage (HF); high-fat diet plus 100 μ L of flax seed oil which contains 52,3% of α -linolenic acid, via gavage (HF+FS); high-fat diet plus physical exercise training (HF+Exe) and high-fat diet plus exercise training plus 100 μ L of flax seed oil (HF+Exe+FS) for another four weeks. The composition of fatty acids in the oil was obtained by gas chromatography analysis (Supplemental Table 2)

Acute aerobic exercise protocol: The mice remained on CT diet and were adapted to the exercise on a motor treadmill for five days, 10 min/day, and the intensity of the exercise was 3 m/min. After two days, the animal were submitted to an incremental exercise testing. The initial intensity of the test was 6 m/min at 0% grade with increments of 3 m/min every 3 min until exhaustion ⁶⁶. The exhaustion occurred after the animals reached the end of the treadmill fives times. The peak workload was measured at the termination of the test and 60% of the peak workload was determined. After two days of resting, the mice were subjected to an acute aerobic exercise protocol

on a treadmill for 1 hour, 0% grade and the intensity of the exercise was 60% of the peak workload previously determined in the incremental load test. Thereafter, fragments of the liver were removed for analysis of gene expression and protein content of GPR120.

TABLE 1 Macronutrient composition of experimental diets (g/kg)

| | Standard chow (CT) | High fat diet (HF) |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ingredients | | |
| Corn Starch (Q.S.P) | 4275 | 1155 |
| Casein | 200 | 200 |
| Sucrose | 132 | 132 |
| Dextrinated Starch | 100 | 100 |
| Soybean Oil | 40 | 40 |
| Lard | 0 | 312 |
| Cellulose | 50 | 50 |
| Mineral Mix | 35 | 35 |
| Vitamin Mix | 10 | 10 |
| L-Cysteine | 3 | 3 |
| Choline | 2.5 | 2.5 |
| Total | 1000 | 1000 |

¹CT, control diet; HF, high fat diet.

Aerobic exercise training protocol: After the development of the obesity, the same protocol of adaptation and determination of the peak workload previously described was applied. The aerobic exercise training consisted of 4 weeks of running on a motor

treadmill, 5 days a week, the intensity of the exercise was 60% of the peak workload, and the volume of the first week was 15 min. The exercise volume was gradually increased (Supplemental Table 1). All exercised animals were sacrificed 24 hours after the last exercise session and their respective controls.

Gas chromatography method for the evaluation of flax seed oil composition: The fatty acids present in the oil were separated by a DB-23 capillary column in gas chromatograph (CGC-6850 Series Gas Chromatography System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Extracted lipids were stored at -20°C , protected from light ¹¹⁰.

Reagents and antibodies: The reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were from Bio-Rad (Richmond, USA). Human recombinant insulin (Humulin R) was from Lilly (Indianapolis, USA). Anti-Akt-sc-8312, rabbit polyclonal antibody (rp), anti-Phospho [Thr 183/185] c-Jun N terminal kinase P-JNK-sc-6254, mouse monoclonal antibody (mm), anti-Interleukin 10 IL-10-sc-1783, goat polyclonal antibody (gp), anti- α -tubulin α -tub-sc-398103 (mm), anti- GPR120 sc-48 203 (gp), anti-GAPDH- sc-25778 (rp) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Anti-Phospho-Glycogen-Synthase-Kinase-3 β [Ser9] P-GSK-3 β -#5558 rabbit monoclonal antibody (mm), anti-Phospho-TAK1 [Ser412] P-TAK1-#9339 (rp), anti-Phospho-Akt [Ser 473] P-Akt-#4051 (mm), anti-Phospho Inhibitor kinase B- α [Ser32/36] P-I κ B α -#9246 (mm) were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Anti- Interleukin-1 β (IL-1 β -503 502, mouse-rat) and anti-TNF α (506102, mouse-rat) were from BioLegend (San Diego, USA).

Intraperitoneal insulin-tolerance test: To evaluate insulin sensitivity, the test was performed before and after the treatment with specific diets and interventions. After 8 hours of fasting, mice groups were submitted to an insulin tolerance test (1 U/kg body

weight⁻¹ of insulin). The insulin was injected intraperitoneally (i.p.) and blood samples were collected from 0 to 30 minutes for serum glucose determination. The constant for the rate of serum glucose disappearance was calculated using the formula $0.693/\text{biological half-life } (t_{1/2})$. The plasma glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of last square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline ¹¹¹.

Intraperitoneal glucose-tolerance test (i.p. GTT): The mice were subjected to an 8 hours of fasting. Before the injection of glucose solution, blood samples were collected (time 0). After this, a solution of 25% glucose (2.0 g/kg body weight) was administered (i.p.) and blood samples were collected from the tail from 0 to 120 minutes for determination of glucose concentrations. Results are presented as the area under glucose curves. Blood glucose of both i.p.ITT or i.p.GTT were determined using Accutrend Plus equipment (Roche, Switzerland).

Immunoblotting: After the injection of the anesthesia (i.p. injection of ketamine (50 mg/Kg body weight⁻¹) and xylazine (20 mg/Kg body weight⁻¹)), the corneal reflexes were verified and assured. Thereafter, the abdominal cavities were opened and the animals received an injection of insulin (100 μL 10^{-6} mol/L) or saline (100 μL) through the portal vein. Fragments of the hepatic tissue were removed after 30 seconds and immediately homogenized. The tissue was pooled, minced and homogenized in extraction buffers with a Polytron PT 10-35 GT (Kinemática AG). The protein quantification was determined using the Bradford method ⁶⁹. The samples were applied in a polyacrylamide gel for separation by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blots were blocked with 5% dry milk at room temperature for 1h and then blotted with specific antibodies. Specific bands were labeled by

chemiluminescence and visualization was performed with a system for imaging fluorescence (G:BOX Chemi XRQ – Syngene - USA).

RNA extraction and real-time PCR: Total RNA was extracted from mouse liver by using TRIzol reagent (Life Technologies). Reverse-transcription was performed using total RNA from liver samples, as described previously ¹¹². The primers for *Gpr120* and *Gapdh* were obtained from ThermoFisher Scientific. Real-time PCR analysis of gene expression was performed in an ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems).

Statistical analysis:

The protein bands present in the blots were quantified using the software UN-SCAN-IT. Initially, all the results were submitted to the Kolmogorov-Smirnov test to check for symmetry. For variables with normal distribution Student's *t* test was applied for comparison of two independent samples (CT and HF). Analysis of variance was used to compare independent samples. Mean values \pm SD were compared using Tukey's test, and $P < 0.5$ was accepted as statistically significant.

Results

Gene expression and protein content of GPR120 after acute physical exercise in lean mice. The mice subjected to the acute physical exercise did not show increase in the gene expression of *Gpr120* after the exercise (Figure 1A). Moreover, the protein content did not differ between the groups (Figure 1B).

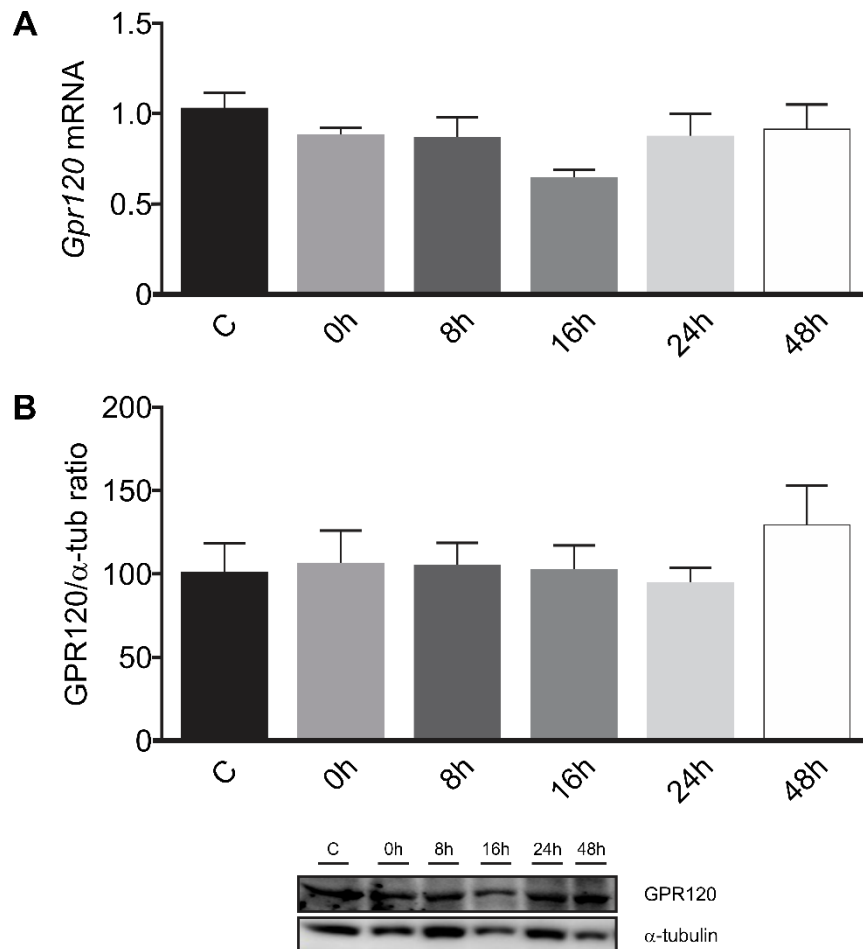


FIGURE 1 *Gpr120* mRNA expression (A) and GPR120 protein content (B) in liver of lean mice after an acute physical exercise session. For qPCR and immublot data, values were first normalized to *Gapdh* mRNA and α -tubulin protein for each sample. Values are means \pm SEMs, $n=5$ for each group. One-factor ANOVA (Tukey's test) was used to compare the mice groups. GPR120, G protein-coupled receptor 120; h, hour.

HF diet increase the body weight and developed insulin resistance. After the 8 weeks of exposure to the HF diet, the mice showed increase in the body weight compared with CT diet. This increase was evidenced from the second week of exposure to high-fat diet (Figure 2A-B). Thereafter, insulin and glucose tolerance tests were performed to determine the extent of insulin resistance and glucose intolerance. HF diet produced a significant increase in the fasting blood glucose levels (Figure 2C). Furthermore, HF decreases the K_{ITT} and increases the glucose area under the curve (AUC) compared with CT (Figure 2C-F).

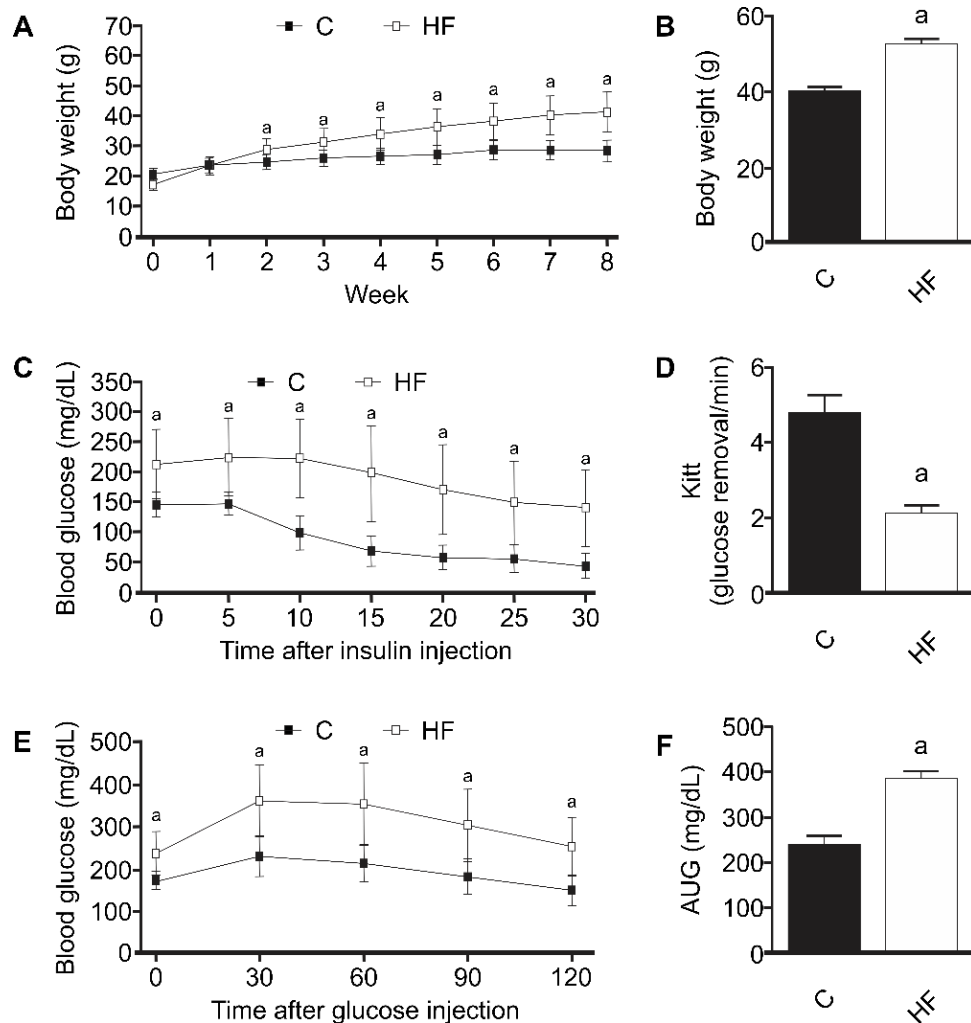


FIGURE 2 Final body weights (A, B) in mice fed CT diet or HF diet for 2 months. Blood glucose levels (C) and constant for glucose removal during an insulin tolerance test (Kitt) (%/min) (D). Blood glucose levels (E) and the area under glucose curve (AUC) (F) during an intraperitoneal glucose tolerance test (i.p.GTT). Values are means \pm SEMs, CT (n=6); HF (n=30). Mean significant difference between (a) – C and HF groups by Student's *t* test ($P < 0.05$). C, standard chow; HF, high fat diet.

HF diet, exercise training and treatment with flax seed oil increases protein content of GPR120 in obese mice. First, the composition of fatty acids in the flax seed oil was obtained by gas chromatography analysis (Table 2). Mice fed HF presented increased protein content of GPR120. Moreover, both HF+FS and HF+Exe produced significant increase in protein content of GPR120 compared with HF group. However, HF+FS+Exe did not show any difference (Figure 3).

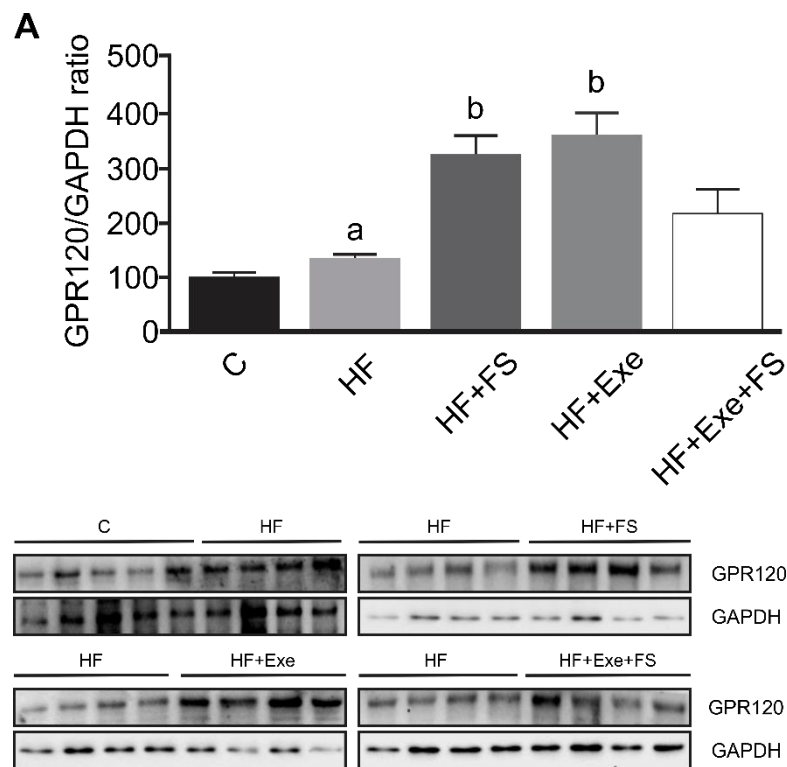


FIGURE 3 Protein content of GPR120 in liver after an four-week experimental period of flax seed oil treatment (HF+LS), exercise training (HF+Exe) and exercise training plus flax seed oil treatment (HF+Exe+LS). The values were first normalized to GAPDH for each sample. Values are means \pm SEMs, CT (n=6); HF (n=7); HF+LS (n=8); HF+Exe (n=7) and HF+Exe+FS (n=8). Mean significant difference between (a) – C and HF groups by Student's *t* test ($P < 0.05$) or (b) – $P < 0.05$ vs HF, HF+LS, HF+Exe and HF+Exe+LS by one-factor ANOVA (Tukey's test). GPR120, G protein-coupled receptor 120; C, standard chow; HF, high fat diet; LS, flax seed oil; Exe, exercise training.

TABLE 2 Fatty acids composition of the flax seed oil (% of total fat)

| Fattys acids | % |
|--------------|----------------|
| C14:0 | 0.0640 ± 0.018 |
| C15:0 | 0.0405 ± 0.008 |
| C16:0 | 5.7330 ± 0.001 |
| C17:0 | 0.0645 ± 0.002 |
| C18:0 | 4.6120 ± 0.001 |
| C20:0 | 0.1701 ± 0.000 |
| C22:0 | 0.1645 ± 0.002 |
| C24:0 | 0.1761 ± 0.020 |
| Σ SFA | 11.025 ± 0,008 |
| C16:1 ω7 | 0.0775 ± 0.002 |
| C17:1 | 0.0455 ± 0.002 |
| C18:1 ω9 | 22.215 ± 0.021 |
| Σ MUFA | 22.493 ± 0.009 |
| C18:2 ω6 | 13.895 ± 0.007 |
| C18:3 ω3 | 52.385 ± 0.021 |
| Σ PUFA | 66.473 ± 0.007 |
| Σ ω6 | 13.895 ± 0.007 |
| Σ ω3 | 52.385 ± 0.021 |
| ω6:ω3 ratio | 0.27:1 |

¹ Values are means 6 SEMs. SFA, short-chain fatty acids; MUFA, medium-chain fatty acids; PUFA, Polyunsaturated fatty acids; ω3, omega-3 fatty acids; ω6, omega-6 fatty acids; ω9, omega-9 fatty acids; Σ, summation.

Exercise training improves insulin sensitivity and reduces body fat: The exercise training and the flax seed oil did not change body weight (Figure 4A-B). However, the mice subjected to the physical exercise and the treatment with flax seed oil together presented the lowest gain in the body mass (Figure 4E). In addition, both HF+Exe and HF+Exe+FS showed reduction in fasting blood glucose compared with the HF group (Figure 4F). Furthermore, the exercised animals showed improves in the K_{ITT} . However, HF+FS did not presented any difference (Figure 4C-D). When mice were subjected to the exercise training, epididymal, mesenteric and retroperitoneal fat showed significantly decreased compared with the HF group (Figura 5A-C).

Exercise training reduces diet-induced inflammation: Mice fed HF diet showed increase in the number of inflammatory markers in the liver (Figura 6A-F). The mice treated with flax seed oil showed decrease in the phosphorylation of JNK and protein content of $TNF-\alpha$. In addition, HF+Exe presented reduction in the phosphorylation or protein content of $I\kappa B\alpha$, JNK, $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$. Moreover, the animals subjected to exercise training and flax seed oil treatment showed decreased in the phosphorylation of JNK and protein content of $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$. However, HF+FS, HF+Exe and HF+Exe+FS did not show difference in the phosphorylation of TAK1 and protein expression of the antiinflammatory cytokine IL-10 compared with HF (Figure 6A-F).

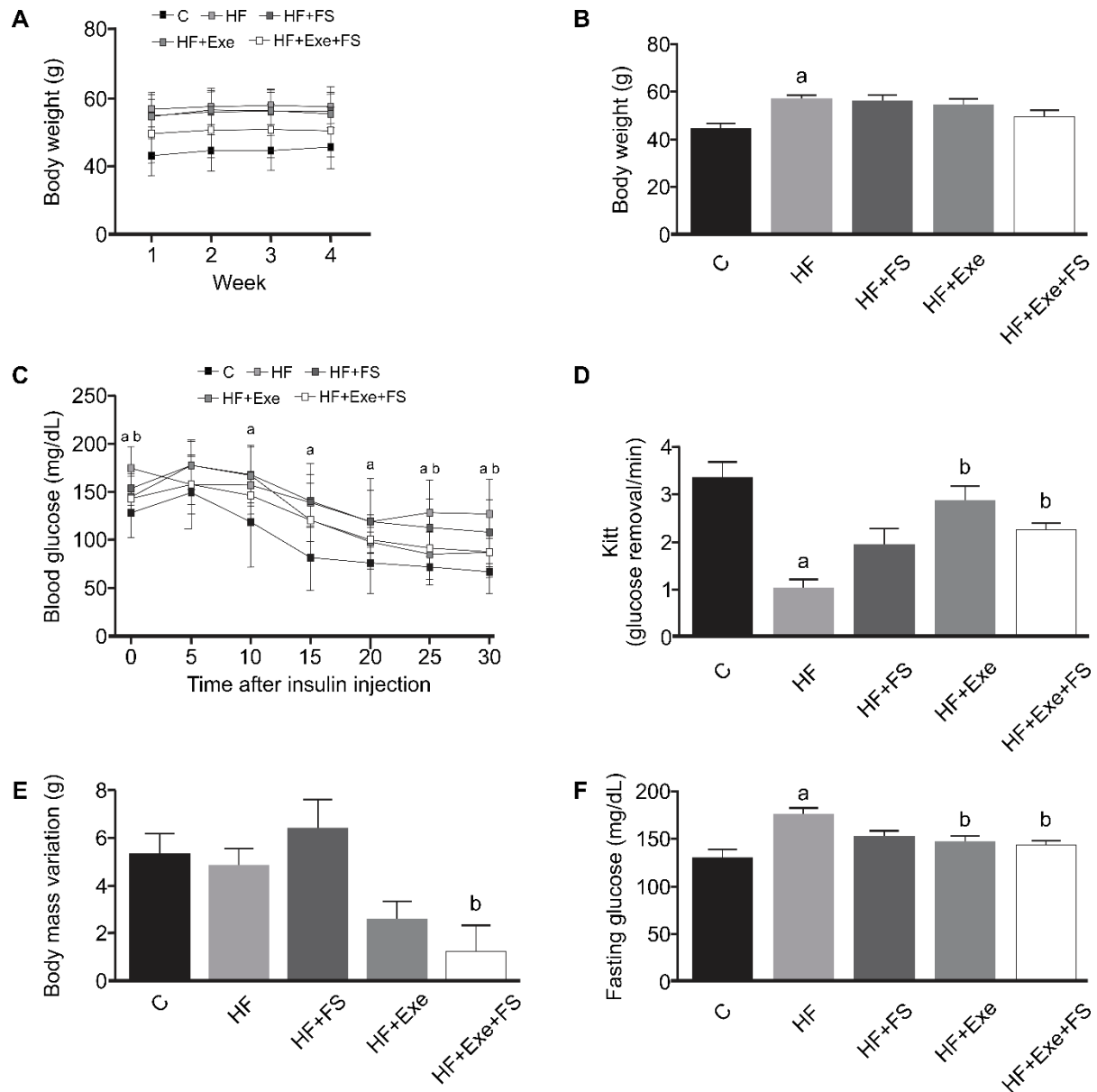


FIGURE 4 Final body weights after an four-week experimental period of flax seed oil treatment (HF+LS), exercise training (HF+Exe) and exercise training plus flax seed oil treatment (HF+Exe+LS) (A, B). Blood glucose levels (C) and constant for glucose removal during an insulin tolerance test (Kitt) (%/min) (D). Body mass variation for each group during the whole experimental period (E) and fasting glucose (F). Values are means \pm SEMs, CT (n=6); HF (n=7); HF+LS (n=8); HF+Exe (n=7) and HF+Exe+FS (n=8). Mean significant difference between (a) – C and HF groups by Student's *t* test ($P < 0.05$) or (b) – $P < 0.05$ vs HF, HF+LS, HF+Exe and HF+Exe+LS by one-factor ANOVA (Tukey's test). C, standard chow; HF, high fat diet; LS, flax seed oil; Exe, exercise training.

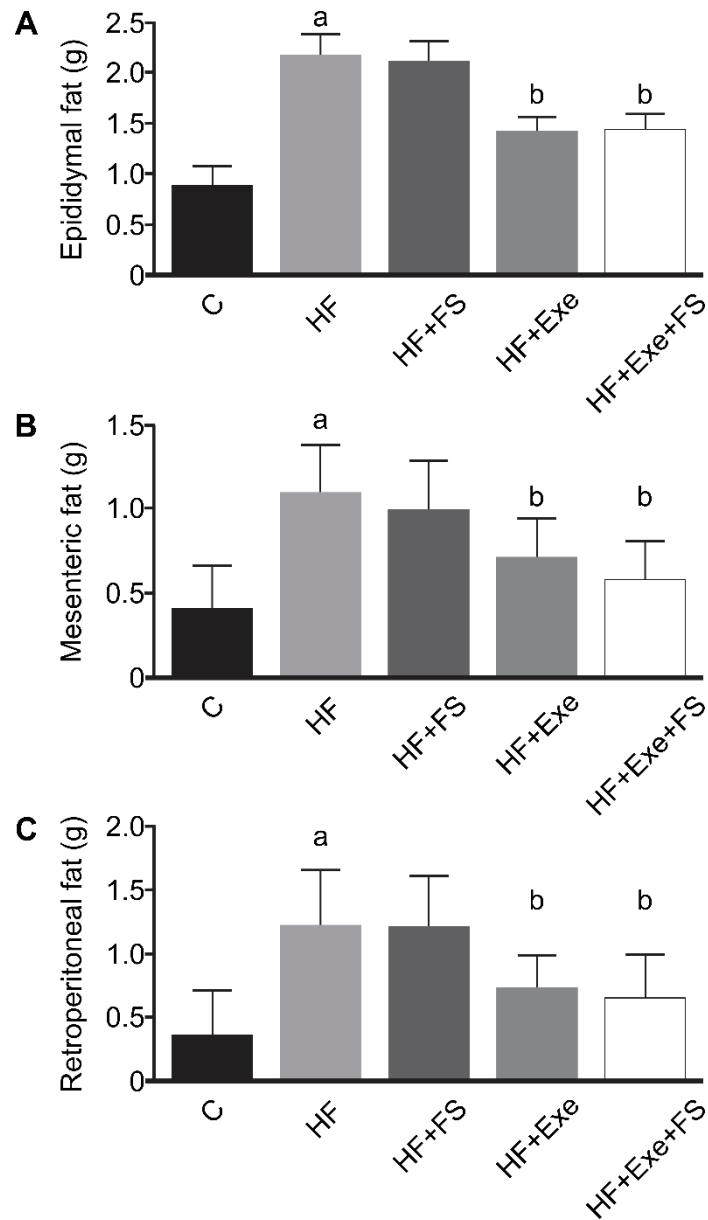


FIGURE 5 Epididymal (A), mesenteric (B) and retroperitoneal (C) fat variation during the whole experimental period. Values are means \pm SEMs, CT (n=6); HF (n=7); HF+LS (n=8); HF+Exe (n=7) and HF+Exe+FS (n=8). Mean significant difference between (a) – C and HF groups by Student's *t* test ($P < 0.05$) or (b) – $P < 0.05$ vs HF, HF+LS, HF+Exe and HF+Exe+LS by one-factor ANOVA (Tukey's test). C, standard chow; HF, high fat diet; LS, flax seed oil; Exe, exercise training

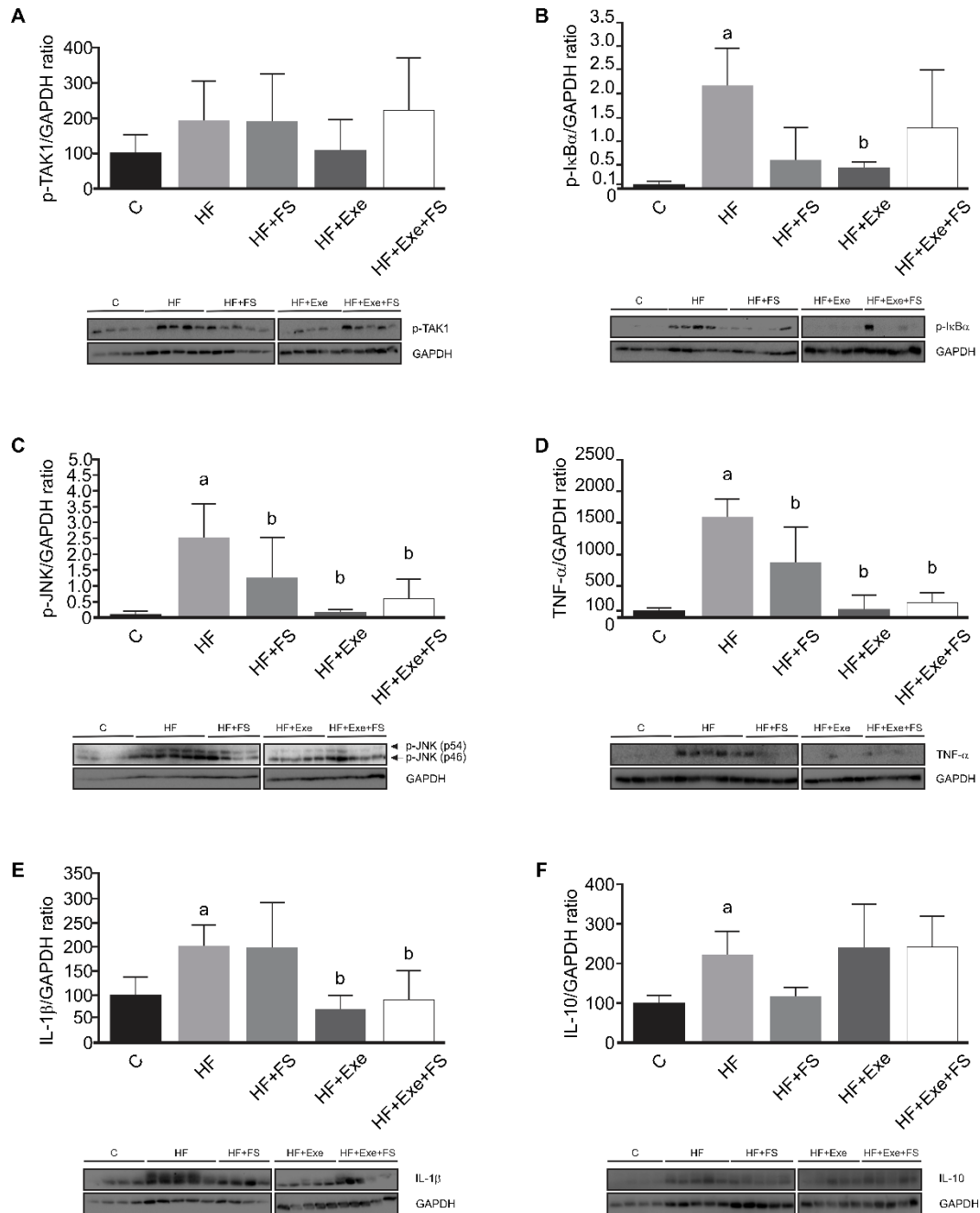


FIGURE 6 Protein content and/or activity of TAK-1 (A), IκBα (B), JNK (C), TNF-α (D), IL-1β (E) and IL-10 (F) after an four-week experimental period of flax seed oil treatment (HF+LS), exercise training (HF+Exe) and exercise training plus flax seed oil treatment (HF+Exe+LS). The values were first normalized to GAPDH for each sample. Values are means ± SEMs, CT (n=6); HF (n=7); HF+LS (n=8); HF+Exe (n=7) and HF+Exe+FS (n=8). Mean significant difference between (a) – C and HF groups by Student's *t* test ($P < 0.05$) or (b) – $P < 0.05$ vs HF, HF+LS, HF+Exe and HF+Exe+LS by one-factor ANOVA (Tukey's test). C, standart chow; HF, high fat diet; LS, flax seed oil; Exe, exercise training; p-TAK1, phospho transforming growth factor-b activated kinase 1; p-IκBα, phospho inhibitor kinase B alpha; p-JNK, phospho c-Jun N-terminal kinase; TNF-α; tumor Necrosis Factor-alpha; IL-1β, Interleukin-1 beta and IL-10, Interleukin-10.

Exercise training and flax seed oil treatment did not improve Akt and GSK-3 β

phosphorylation: Immublot analysis revealed that insulin stimulated Akt phosphorylation in the liver was significantly reduced in HF group. However, no difference was found in the phosphorylation of GSK-3 β (Figure 7A-B). In addition, insulin did not improve Akt and GSK-3 β phosphorylation in HF+FS, HF+Exe and HF+Exe+FS groups in compared with HF (Figure 7C-D).

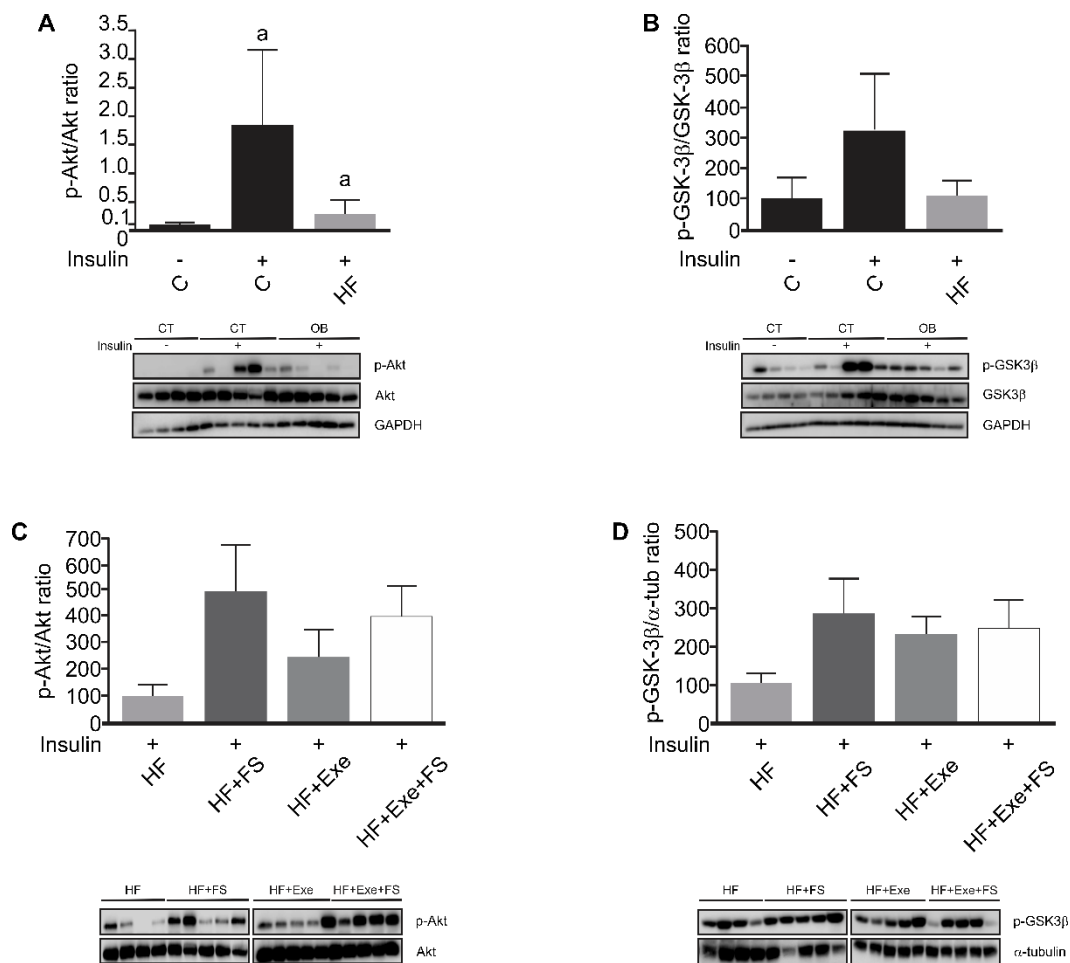


FIGURE 7 After experimental period, mice were anesthetized and acutely treated through portal vein with saline (100 μ L) (-) or insulin (100 μ L 10^{-6} mol/L) (+). Phosphorylation of Akt (A, C) and GSK-3 β (B, D). The values were first normalized to Akt, GSK-3 β or α -tubulin for each sample. Values are means \pm SEMs, CT (n=6); HF (n=7); HF+LS (n=8); HF+Exe (n=7) and HF+Exe+FS (n=8). Mean significant difference between (a) – C(-) vs C(+) or C(+) vs HF(+) by Student's *t* test ($P < 0.05$) or (b) – $P < 0.05$ vs HF, HF+LS, HF+Exe and HF+Exe+LS by one-factor ANOVA (Tukey's test). C, standart chow; HF, high fat diet; LS, flax seed oil; Exe, exercise training; p-Akt, phospho Akt; p-GSK-3 β ; phospho GSK-3 β .

Discussion

The prevalence rate of obesity is increasing around the world (1, 2). Moreover, obesity can facilitate the development of comorbidities such as insulin resistance, type 2 diabetes ⁴, atherosclerosis ⁵, neurodegenerative diseases ¹⁴ and hepatic steatosis ²². Therefore, because of the alarming actual scenario and future concerns, therapeutic alternatives are being intensively investigated. Thereafter, ω 3 fatty acids have been explored exhaustively and additional anti-inflammatory mechanisms have been determined ^{50–52}. However, these mechanisms are poorly understood.

Recently, a new G protein-coupled receptor called GPR120 was described. This receptor can be activated by ω 3 fatty acids and seems to be able to transduce some of the activities of ω 3 fatty acids (16, 17). However, little is known about the mechanisms that regulate the GPR120 expression. Furthermore, the physical exercise is also able to reduce the metabolic inflammation present in obesity and improve insulin action (18, 20). In this context, nutrition and physical exercise emerge as interesting therapeutic approaches against obesity and comorbidities.

In the present study, we hypothesized that physical exercise could modulate the expression of the GPR120 in the liver. Firstly, lean mice were used to investigate the effects of acute exercise on the hepatic expression of GPR120 and identify the best moment of GPR120 expression after the exercise session.

Our results revealed that the acute physical exercise did not improve gene expression and protein content of GPR120 in the liver of lean mice. Previous studies showed GPR120 expression in many tissues such as lung ⁷⁴, intestine ⁷⁸, adipose tissue ⁷⁵, hypothalamus ⁵², taste buds ⁷⁶ and macrophages ⁷⁷. Furthermore, GPR120 expression

was also described in the liver, mainly in the Kupffer cells ⁵⁴. Nevertheless, fewer studies have addressed the role of physical exercise in the modulation of GPR120. In this context, a recent study showed that GPR120 is not involved in the regulation of energy metabolism in lean mice during an acute physical exercise session on treadmill ⁷⁹.

Moreover, we assessed the protein content of GPR120 in the liver of obese mice after exercise training and flax seed oil interventions. HF diet resulted in a significant increase in the protein content of GPR120 compare with CT. This is in line with previous studies showing that HF diet can improve GPR120 expression ^{89–92}. In addition, Chen et al. ⁹⁴ showed that the transcription factor C/EBP β seems to be able to enhance the GPR120 expression. Moreover, the HF diet increases the expression of C/EBP β . Therefore, our data suggest that HF diet appears to be capable of regulate GPR120 expression.

The flax seed oil treatment also increases the protein content of GPR120. Consistent with this, a recent study showed that diets supplemented with ω 3 fatty acids enhance the GPR120 expression in rats ¹⁰⁰. Furthermore, Nobili et al ⁵⁴ found increase in the expression of GPR120 in children diagnosed with non-alcoholic fatty liver disease after a treatment with DHA. In addition, exercise training was also able to increase the protein content of GPR120. However, little is known about the mechanisms by which the physical exercise could modulate the expression of GPR120. In this context, the transcription factor C/EBP β becomes a potential subject of study. Nevertheless, the mice subjected to the exercise training plus the flax seed oil treatment did not presented any difference in the protein content of GPR120.

We evaluated the effect of exercise training and the flax seed oil treatment on whole body insulin action and glucose homeostasis. HF+Exe and HF+Exe+FS presented improvement in insulin action and glucose homeostasis to levels similar to those in lean controls. This is in line with a previous study that showed acute or chronic physical exercise is able to improve insulin action in obesity mice ¹⁰⁹. However, only the treatment with flax seed oil did not improve insulin action. Consistent with this, the mice subjected to the exercise training decrease fat mass compared with the HF.

In addition, we investigated the number of inflammatory markers after the interventions with exercise training and flax seed oil. The exercised mice presented a consistent reduction in the inflammatory markers. On the other hand, the flax seed oil did not change the activity of the proteins involved with the inflammatory process. It should be noted that we did not observe any difference in the phosphorylation of Akt and GSK3 β after exercise training and flax seed oil treatment. This may suggest that the improvement in glucose homeostasis obtained in the present study is certainly an outcome of reduced inflammation seen in the exercised animals.

In summary, our results show that the acute physical exercise is not involved with the modulation of GPR120 expression in the liver of lean mice. On the other hand, the exercise training was able to improve the protein content of GPR120 in obese mice. Consistent with this, the flax seed oil also increased the protein content of GPR120. We believe that this is the first study to investigate the role of physical exercise in the modulation of GPR120 expression. Therefore, the present study adds to our understanding about the regulation of GPR120 expression in the liver of obese animals and can contribute to the structuring of interesting approaches against obesity.

Acknowledgments

GPF and DEC conceived and designed the experiments, GPF, RCG, MPB, MD, CBV and DEC performed the experiments, GPF and DEC analyzed the data, ASS, ERR, JRP and DEC contributed reagents/materials/analysis tools, GPF and DEC wrote the paper.

References

1. Gluckman PD, Hanson M, Zimmet P, Foster T. Losing the War Against Obesity: The Need for a Developmental Perspective. *Sci Transl Med*. 2011;3(93):1–4.
2. Scully T. Society at large. *Nature*. 2014;508(7496):50–1.
3. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840–6.
4. Semenkovich CF. Review series Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1813–22.
5. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):415–45.
6. Saltiel AR, Kahn CR. Glucose and Lipid Metabolism. 2001;414:799–806.
7. Lancaster GI, Febbraio MA. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. *Trends Immunol*. 2014;35:262–9.
8. Lumeng CN, Saltiel AR. Review series Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *Life Sci*. 2011;121(6):2111–7.
9. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 2012;7(1):e30571.

10. Oliveira V, Marinho R, Vitorino D, Santos G, Moraes J, Dragano N, et al. Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology*. 2015;156(11):en.2014–1880.
11. Lee T, Hoover R, Williams J, Sperling R, Ravalese J, Spur BW, et al. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med*. 1985;312(19):1217–24.
12. Simon MC, Bilan S, Nowotny B, Dickhaus T, Burkart V, Schloot NC. Fatty acids modulate cytokine and chemokine secretion of stimulated human whole blood cultures in diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(3):383–93.
13. Kebede MA, Alquier T, Latour MG, Poitout V. Lipid receptors and islet function: Therapeutic implications?. *Diabetes, Obes Metab*. 2009;11:10–20.
14. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI KA. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59:251–62.
15. Wang J, Wu X, Simonavicius N, Tian H, Ling L. Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem*. 2006;281(45):34457–64.
16. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sujimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005;11(1):90–4.
17. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*. 2010;142(5):687-98.
18. Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes*. 2011;60(3):784-96.

19. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. *PLoS Biol.* 2010;8(8):31–2.
20. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJS, de Pinho R a, Velloso L a, de SOUZA CT. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1 α pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J Physiol.* 2009;587:2069–76.
21. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123:1939–51.
22. Ferreira JCB, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(6):760-765.
23. Oliveira DD, Baião NC, Cançado S V, Grimaldi R, Souza MR, Lara LJC, Lana AMQ. Effects of lipid sources in the diet of laying hens on the fatty acid profiles of egg yolks. *Poult Sci.* 2010;89(11):2484–90.
24. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. Estimates of in vivo insulin action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68(2):374–8.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
26. Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol.* 2008;48:628–37.
27. De Felice FG, Ferreira ST. Inflammation, Defective Insulin Signaling, and Mitochondrial Dysfunction as Common Molecular Denominators Connecting Type 2 Diabetes to Alzheimer Disease. *Diabetes.* 2014;63(7):2262–72.

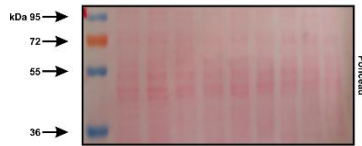
28. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679–89.
29. Mizuta K, Zhang Y, Mizuta F, Hoshijima H, Shiga T, Masaki E, Emala CW. Novel identification of the free fatty acid receptor FFAR1 that promotes contraction in airway smooth muscle. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2015;81(22):ajplung.00041.2015.
30. Ulven T, Christiansen E. Dietary Fatty Acids and Their Potential for Controlling Metabolic Diseases Through Activation of FFA4/GPR120. *Annu Rev Nutr*. 2015;35:239–63.
31. Gotoh C, Hong Y-H, Iga T, Hishikawa D, Suzuki Y, Song S-H, et al. The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354(2):591–7.
32. Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T, Kitabayashi N, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T. Colocalization of GPR120 with phospholipase-C β 2 and α -gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci Lett*. 2009;450(2):186–90.
33. Im D-S. Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages. *Eur J Pharmacol*. Elsevier; 2015;4:1–8.
34. Nobili V, Carpino G, Alisi A, De Vito R, Franchitto A, Alpini G, Onori P, Gaudio E. Role of Docosahexaenoic Acid Treatment in Improving Liver Histology in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*. 2014;9(2):e88005.
35. Fujitani M, Matsumura S, Masuda D, Yamashita S, Fushiki T, Inoue K. CD36, but not GPR120, is required for efficient fatty acid utilization during endurance exercise. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014;78(11):1871–8.
36. Cornall LM, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ. Diet-induced obesity up-regulates the abundance of GPR43 and GPR120 in a tissue specific manner. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol [Internet]*. 2011;28(5):949–58.

37. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012;483:350–4.
38. Paulsen SJ, Larsen LK, Hansen G, Chelur S, Larsen PJ, Vrang N. Expression of the Fatty Acid Receptor GPR120 in the Gut of Diet-Induced-Obese Rats and Its Role in GLP-1 Secretion. *PLoS One*. 2014;9(2):e88227.
39. Widmayer P, Goldschmid H, Henkel H, Kuperr M, Königsrainer A, Breer H. High fat feeding affects the number of GPR120 cells and enteroendocrine cells in the mouse stomach. *Front Physiol*. 2015;6(February):1–8.
40. Chen K, Zhou J, Zhang F, Zhang F, Zhang R. Transcription factor C / EBP β promotes the transcription of the porcine GPR120 gene. *J Mol Endocrinol*. 2015;56(2):91–100.
41. Cheshmehkani A, Senatorov IS, Kandi P, Singh M, Britt A, Hayslett R, et al. Fish oil and flax seed oil supplemented diets increase FFAR4 expression in the rat colon. *Inflamm Res*. 2015;64(10):809–15.

Online Supporting Material (OSM)

A. Figure 3 - Ponceau-S

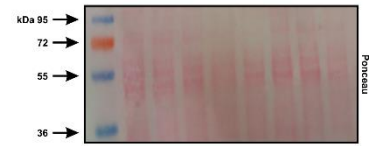
C and OB



OB and OB+Exe



OB and OB+LS

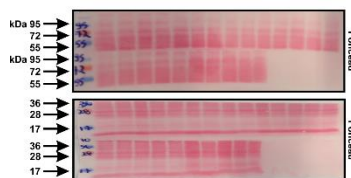


OB and OB+Exe+LS

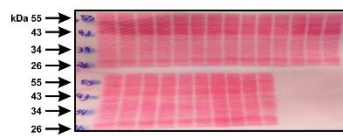


B. Figure 6 - Ponceau-S

A



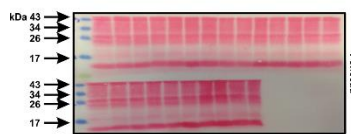
B



C



D



E



F



C. Figure 7 - Ponceau-S

A



B



C



D

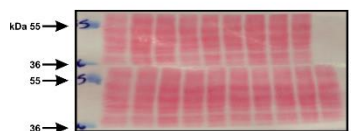


FIGURE 1 Ponceau-S of the blots from the Figure 3 (A), Figure 6 (B) and Figure 8 (C).

TABLE 1 Exercise training protocol

| Week | Peak workload (%) | Volume (min) | Frequency (weekly) | Grade (°) |
|-------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------|
| 1 | 60 | 15 | 5 | 0 |
| 2 | 60 | 30 | 5 | 0 |
| 3 | 60 | 45 | 5 | 0 |
| 4 | 60 | 60 | 5 | 0 |

¹ Min, minutos; °, grade.

Anexo 2: Comitê de Ética



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Modulação da Expressão Hepática do Receptor GPR120 mediada por Exercício Físico em Roedores Swiss Obesos" (protocolo nº 3512-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra / Guilherme Pedron Formigari, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 02 de setembro de 2014.

Campinas, 02 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Anexo 3:**Teste de carga incremental para determinação da P_{máx} dos grupos 0h; 8h; 16h; 24h e 48 horas**

| Grupos /Animal | P_{máx} (m/min) | 60% P_{máx} (m/min) | Grupo/ Animal | P_{máx} (m/min) | 60% P_{máx} (m/min) | Grupo /Animal | P_{máx} (m/min) | 60% P_{máx} (m/min) |
|------------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 0h | | | 8h | | | 16h | | |
| 1 | 30 | 18 | 1 | 33 | 19,8 | 1 | 39 | 23,4 |
| 2 | 30 | 18 | 2 | 36 | 21,6 | 2 | 39 | 23,4 |
| 3 | 30 | 18 | 3 | 36 | 21,6 | 3 | 39 | 23,4 |
| 4 | 30 | 18 | 4 | 36 | 21,6 | 4 | 36 | 21,6 |
| 5 | 30 | 18 | 5 | 36 | 21,6 | 5 | 36 | 21,6 |
| M | 30 | 18 | M | 35,4 | 21,24 | M | 37,8 | 22,68 |
| DP | 0 | 0 | DP | 1,2 | 0,72 | DP | 1,4697 | 1,4697 |
| Grupos / Animal | P_{máx} (m/min) | 60% P_{máx} (m/min) | Grupo/ Animal | P_{máx} (m/min) | 60% P_{máx} (m/min) | | | |
| 24h | | | 48h | | | | | |
| 1 | 39 | 23 | 1 | 42 | 25,2 | | | |
| 2 | 39 | 23 | 2 | 42 | 25,2 | | | |
| 3 | 39 | 23 | 3 | 42 | 25,2 | | | |
| 4 | 39 | 23 | 4 | 39 | 23,4 | | | |
| 5 | 39 | 23 | 5 | 39 | 23,4 | | | |
| M | 39 | 23 | M | 40,8 | 24,48 | | | |
| DP | 0 | 0 | DP | 1,4697 | 0,8818 | | | |

Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos 0h; 8h; 16h; 24h e 48 horas. Para extração do tecido hepático utilizou-se os tempos de, 0h – extração de tecido hepático imediatamente após a sessão de exercício físico agudo (n=5); 8h – extração após 8 horas do exercício (n=5); 16h – extração após 16 horas do exercício (n=5); 24h – extração após 24 horas do exercício (n=5); 48h – extração após 48 horas do exercício (n=5); P_{máx} – potência máxima atingida no teste incremental; 60% P_{máx} – refere-se ao cálculo de 60% da potência máxima, sendo esta a velocidade dos animais no protocolo de exercício físico agudo; M – média; DP – desvio padrão (\pm).

Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos Exe+Soro, Exe+Glicose, Exe+OL e Exe+OL+Glicose.

| Grupos/Animal | P _{máx} (m/min) | 60% P _{máx} (m/min) | Grupos/ Animal | P _{máx} (m/min) | 60% P _{máx} (m/min) |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Exe+Soro | | | Exe+Glicose | | |
| 1 | 21 | 13 | 1 | 30 | 18 |
| 2 | 21 | 13 | 2 | 27 | 16,2 |
| 3 | 12 | 7,2 | 3 | 24 | 14,4 |
| 4 | 21 | 13 | 4 | 30 | 18 |
| 5 | 21 | 13 | 5 | 30 | 18 |
| | | | 6 | 30 | 18 |
| M | 19,2 | 12 | M | 28,5 | 17,1 |
| DP | 4,0249 | 2,5550 | DP | 2,5100 | 1,5060 |
| Grupos/Animal | P _{máx} (m/min) | 60% P _{máx} (m/min) | Grupo/ Animal | P _{máx} (m/min) | 60% P _{máx} (m/min) |
| Exe+OL | | | Exe+OL+Glicose | | |
| 1 | 36 | 21,6 | 1 | 33 | 19,8 |
| 2 | 36 | 21,6 | 2 | 33 | 19,8 |
| 3 | 36 | 21,6 | 3 | 33 | 19,8 |
| 4 | 33 | 19,8 | 4 | 33 | 19,8 |
| 5 | 33 | 19,8 | 5 | 33 | 19,8 |
| 6 | 33 | 19,8 | | | |
| M | 34,2857 | 20,5714 | M | 33 | 19,8 |
| DP | 1,6036 | 0,9621 | DP | 0 | 0 |

Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos Exe+Soro, Exe+Glicose, Exe+OL e Exe+OL+Glicose. Exe+Soro – exercício físico agudo + tratamento com soro (n=5); Exe+Glicose – exercício físico + glicose, via i.p (n=6); Exe+OL – exercício físico + tratamento com óleo de linhaça, via gavagem (n=6); Exe+OL+Glicose – exercício físico + tratamento com óleo de linhaça, via gavagem, e glicose, via i.p (n=5); OL – óleo de linhaça; P_{máx} – potência máxima atingida no teste incremental; 60% P_{máx} – refere-se ao cálculo de 60% da potência máxima, sendo esta a velocidade dos animais no protocolo de exercício agudo; M – média; DP – desvio padrão (\pm).

Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL.

| Grupos/Animal | P _{máx} (m/min) | 60% P _{máx} (m/min) | Grupos/ Animal | P _{máx} (m/min) | 60% P _{máx} (m/min) |
|---------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| OB+EXE | | | OB+EXE+OL | | |
| 1 | 30 | 18 | 1 | 27 | 16,2 |
| 2 | 33 | 19,8 | 2 | 33 | 19,8 |
| 3 | 30 | 18 | 3 | 33 | 19,8 |
| 4 | 27 | 16,2 | 4 | 27 | 16,2 |
| 5 | 30 | 18 | 5 | 36 | 21,6 |
| 6 | 27 | 16,2 | 6 | 33 | 19,8 |
| 7 | 30 | 18 | 7 | 36 | 21,6 |
| | | | 8 | 33 | 19,8 |
| M | 29,57 | 17,74 | M | 32,25 | 19,35 |
| DP | 2,070 | 1,242 | DP | 3,495 | 2,097 |

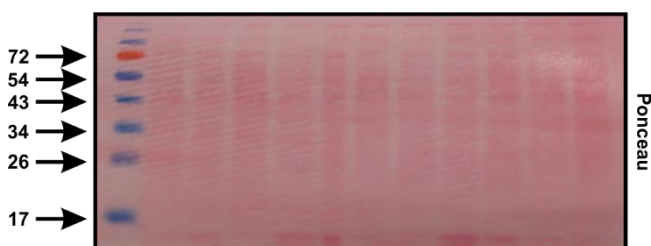
Teste de carga incremental para determinação da potência máxima dos grupos OB+EXE e OB+EXE+OL. Camundongos Swiss foram expostos, durante 8 semanas, a dieta hiperlipídica. Em seguida, os animais foram adaptados em esteira rolante. Após dois dias de repouso, realizaram o teste de carga incremental, para determinação da potência máxima (P_{máx}). Posteriormente, o período de treinamento físico foi iniciado. OB+EXE – animais obesos e resistentes à insulina expostos ao treinamento físico (n=7). OB+EXE+OL – animais obesos e resistentes à insulina expostos ao treinamento físico e ao tratamento com óleo de linhaça (fonte de ω 3 – 100 μ L/dia) (n=8). Dados referente a média e desvio padrão (\pm) de cada grupo experimental.

Anexo 4:

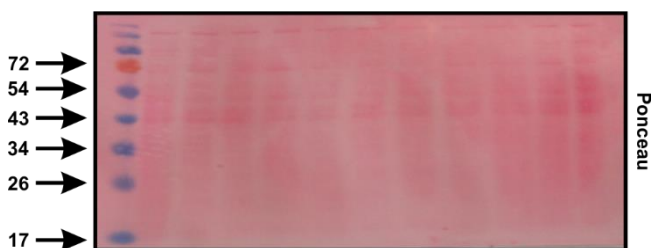
Blot – Conteúdo proteico de GPR120 após o protocolo de exercício físico agudo:
 não foi realizado coloração com o ponceau.

Blot – Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos CTL e Exe+Soro:

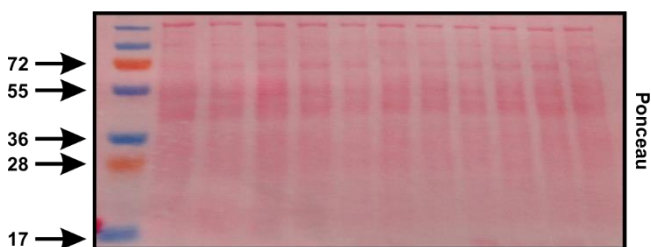
Proteínas p-Akt e Akt:



Proteína p-GSK-3 β :

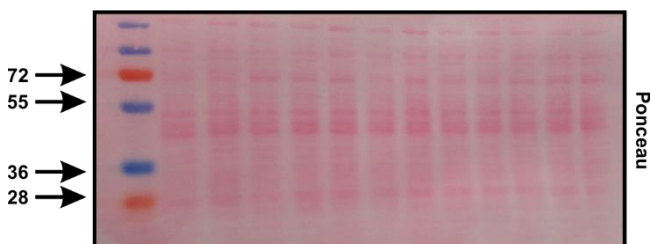


Proteína GSK-3 β :

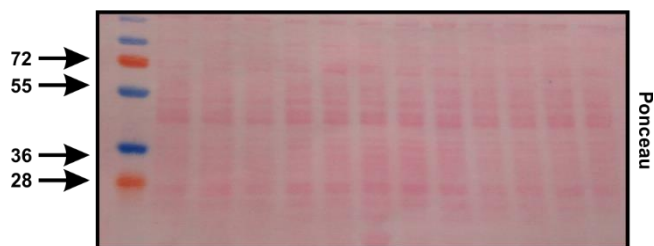


Blot – Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+Glicose:

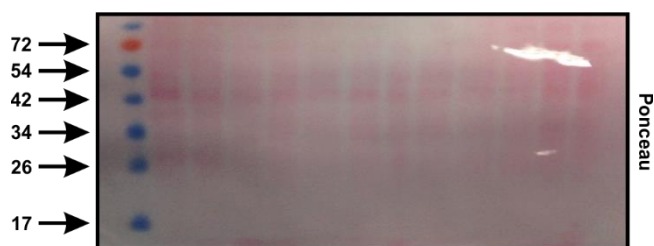
Proteínas p-Akt e Akt:



Proteína p-GSK-3 β :

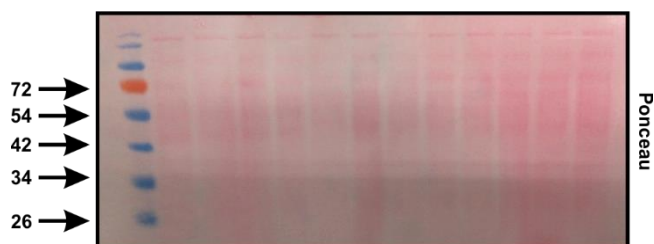


Proteína GSK-3 β :

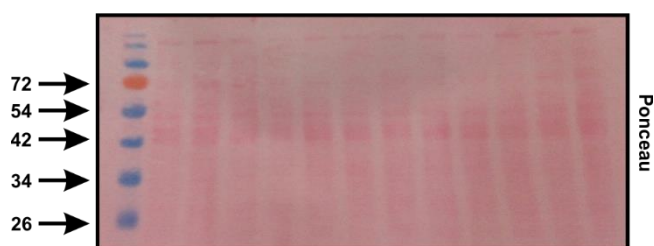


Blot – Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+OL:

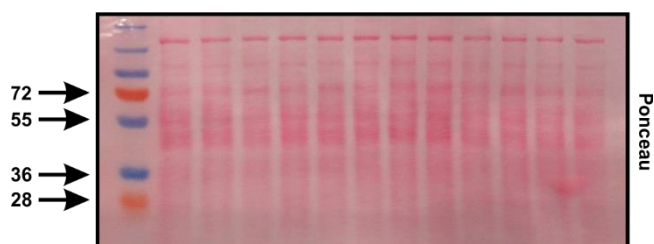
Proteínas p-Akt e Akt:



Proteína p-GSK-3 β :

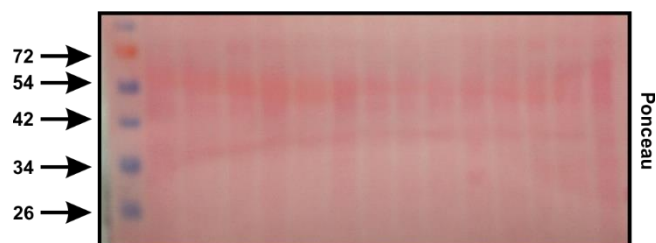


Proteína GSK-3 β :



Blot – Fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β e conteúdo proteico de GPR120 nos grupos Exe+Soro e Exe+OL+Glicose:

Proteínas p-Akt e Akt:



Proteína p-GSK-3 β :



Proteínas GPR120 e GAPDH:



